

Verfahren und Mittel zur Bestimmung von definierten Zuständen oder Veränderungen in der Uterusschleimhaut oder im Epithel anderer Organe

MA 101330 PCT/PTO 05 DEC 2005

Die Erfindung betrifft Verfahren und Mittel zur Bestimmung von definierten Zuständen oder Veränderungen in der Uterusschleimhaut oder im Epithel anderer Organe, insbesondere zur Diagnostik der Schwangerschaft und deren Störungen sowie die Diagnostik des Geburtsbeginnes und zum Feststellen optimaler Implantationsbedingungen im Uterus, und die Diagnostik von physiologischen und pathologischer Epithelzuständen (Karzinom). Anwendungsgebiet ist die Medizin, insbesondere die Gynäkologie mit den Fachgebieten Reproduktionsmedizin und Geburtsmedizin.

Humanes Choriongonadotropin (Chorionic Gonadotrophin hCG) ist ein Glykoprotein und besteht aus zwei Untereinheiten α hCG und β hCG in nicht-kovalenter Bindung (1). Für die Untereinheit α hCG ist ein Gen bekannt (Chromosom 6q21.1-q 23). Für die Untereinheit β CG sind 7 Gene β 8, β 7, β 6, β 5, β 3, β 1 und β 2 bekannt (Chromosom 19q13.3).

Während der Schwangerschaft werden durch den Trophoblasten in der Gebärmutter größere Mengen hCG-Dimer und freie α hCG- und β hCG-Moleküle gebildet und in das Blut sezerniert. Embryonales trophoblastäres Gewebe exprimiert fast ausschließlich hCG β 5, β 8 und β 3. Diese β hCG-Untereinheiten werden daher auch trophoblastäres β hCG (t β hCG) oder Typ II- β hCG genannt.

Aber auch in einigen nicht-trophoblastären Geweben wird hCG bzw. seine Untereinheiten in geringen Mengen exprimiert (2-6). Nicht-trophoblastäres Gewebe, wie z. B. Mamma, Lunge, Prostata, Blase, Colon, exprimieren fast ausschließlich hCG β 7 und β 6. Diese β hCG-Untereinheiten werden daher auch als nicht- trophoblastäres β hCG oder Typ I- β hCG bezeichnet (7).

Auch im Blut nichtschwangerer, gesunder Menschen werden daher hCG-Konzentrationen von hCG bis 1000 pg/ml und von β hCG bis 100 pg/ml beobachtet (8, 9). Höhere β hCG-Serumwerte deuten auf einen gonadalen oder nicht-gonadalen Tumor hin und kennzeichnen eine ungünstige Prognose, wie bei Lungen-, Blasen-, Prostata-, Colon-, Nierenzell- und Mammakarzinom beschrieben (5, 10-14).

Während die Untereinheiten des Typ II- β hCG (β 5, β 8 und β 3) an Position 117 (Exon 3) der Aminosäuresequenz ein Aspartat (Asp, D) enthalten, enthält Typ I- β hCG (β 7 und β 6) an

BEST AVAILABLE COPY

Position 117 ein Alanin (Ala, A). Das β hCG-Gen $\beta 6$ ist ein Allel von $\beta 7$ mit Differenzen in der 5'-nichttranslatierenden Sequenz des Promotorgens (Exon 1) und in der translatierenden Sequenz (Exon 2) der β hCG-Untereinheit. Nur die Gene $\beta 8$, $\beta 7$, $\beta 6$, $\beta 5$ und $\beta 3$ codieren und exprimieren ein β hCG-Proteinmolekül von 145 Aminosäuren (Exon 2 und Exon 3). Die Gene hCG $\beta 1$ und $\beta 2$ können zwar auch in einigen Geweben transkribiert werden, codieren aber ein Protein von nur 132 Aminosäuren mit unterschiedlicher Sequenz zum β hCG (15-17).

Das hCG-Molekül ist gut charakterisiert durch bekannte Standardpräparationen von bisher 24 monoklonalen hCG-Antikörpern der „International Society of Oncodevelopmental Biology and Medicine“ (ISOBM), die verschiedene definierte Epitope auf der α hCG-Untereinheit ($\alpha 1$ - $\alpha 7$, n=7), auf der β hCG-Untereinheit ($\beta 1$ - $\beta 9$, n=9), auf dem β hCG-core fragment (cf $\beta 10$ -cf $\beta 13$, n=4) und auch konformationsabhängige Epitopen des intakten $\alpha\beta$ -Heterodimers ($\alpha\beta 1$ - $\alpha\beta 4$, n=4) spezifisch und in hoher Epitopaffinität erkennen (18-20).

Die Antikörper erkennen bevorzugt Epitope in der räumlichen Aminosäureanordnung des hCG-Moleküls, d. h. seiner Tertiär- und Quartärstruktur (17, Fig. 2 und 3 in 18). Deswegen werden für die Präparation der Hybridome zur Bildung obengenannter monoklonaler ISOBM-Antikörper weitgehend WHO-Referenzhormon-Präparationen des hCG respektive β hCG der International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) als adäquate Antigen-determinanten verwendet. Ausnahmen bilden die β hCG-Epitope $\beta 8$ (AS 137 bis 144) und $\beta 9$ (AS 109 bis 116) des C-terminalen Endes (CTP) sowie ein Anteil des β hCG-Epitopes $\beta 1$ (AS 1 bis 10) am N-terminalen Ende von β hCG, die randständig an der Oberfläche des hCG-Dimers in Cystinknoten-Struktur und weitgehend unbeeinflusst von der Tertiärstruktur ein immunologisches Antigenpotential darstellen (21, 22). Diese linearen β hCG-Epitop-Abschnitte um etwa AS 1-16, AS 108-123 und AS 137-144 werden von monoklonalen β hCG-Antikörpern erkannt, die mit der Methode der carriergebundenen synthetischen Peptide als Antigen-determinante der ISOBM-Antikörper produziert werden (18, 19, 21, 22).

Für die Antigenregionen $\beta 1$, $\beta 8$, $\beta 9$ des β hCG-Moleküls (Fig. 3 in 18)-sind bereits ISOBM- β hCG-Antikörper dargestellt worden, die auf der bekannten Aminosäuresequenz der trophoblastären (oder plazentaren) β hCG-Untereinheit beruhen. Besonders die Aminosäuresequenz um 108-123 des C-terminalen Endes von β hCG (β hCG-CTP),

charakterisiert als Epitop $\beta 9$, zeigt eine hohe Antigenizität (21). In etwas geringerem Maß trifft es auch für die Aminosäuresequenz um 1-16 als Anteil des Epitopes $\beta 1$ zu (23). Antikörper, mit synthetischen Peptiden gegen diese Peptidsequenzen erzeugt, erkennen die native trophoblastäre β hCG-Untereinheit spezifisch (18, 19, 21, 23, 24).

In der Vergangenheit sind verschiedene Studien mit dem Ziel durchgeführt worden, die β hCG-Transkripte in verschiedenen normalen und neoplastischen Geweben nicht-trophoblastärer Herkunft mit semiquantitativer Methode nachzuweisen (5, 12, 13, 25). Diese Methoden zeigen, daß β hCG in normaler Plazenta (26), gesunden Testes (6), aber auch neoplastischen Testes (27) und neoplastischem Blasengewebe (28) transkribiert wird. In diesen Studien wird jedoch nicht zwischen Typ I- β hCG und Typ II- β hCG unterschieden.

Dafür sind unterschiedliche Testkits vorgeschlagen worden, die mit unterschiedlicher Epitop-Spezifität arbeiten (29) und die Bestimmung des trophoblastären Gesamtmoleküls $\alpha\beta$ hCG (Gesamt-hCG) oder der einzelnen Untereinheiten des Moleküls β hCG und α hCG ermöglichen (18). Speziell für die Schwangerschaftstests und Diagnostik von Blasenmole und Chorion-karzinom werden Verfahren angewendet, in denen das heterodimäre trophoblastäre Gesamtmolekül hCG allein (Gesamt-thCG) oder in der Summe mit der freien Untereinheit des trophoblastären β hCG (Gesamt-thCG plus t β hCG) oder als freie t β hCG-Untereinheit allein bestimmt werden. Die Heterogenität des trophoblastären hCG im biologischen Material (intaktes $\alpha\beta$ -Heterodimer, freies α hCG, freies t β hCG, t β hCG core-Fragment, nicked thCG, nicked t β hCG), bezogen auf die Bindung an den jeweilig verwendeten Antikörper, erschweren die genaue Bestimmung und die Standardisierung eines möglichen Nachweisverfahrens für das epitithale hCG. Eine zusätzliche Heterogenität der t β hCG-Bestimmung in der sekretorischen Zyklusphase und frühen Schwangerschaft kann im geringen Grad auch zwischen den vier nativen, hyperglykosylierten oder desialylierten Kohlenhydratseitenketten des C-terminalen Endes (CTP) von t β hCG (Aminosäure 120 bis 145) auftreten, wie sie different in der frühen bis mittleren Schwangerschaft und bei Chorion-Karzinom im trophoblastären β hCG beobachtet worden sind (31, 33-37).

Die bisher bekannten Schwangerschaftstests haben den Nachteil, dass sie häufig falsch positive Ergebnisse liefern.

Die bisher bekannten Schwangerschaftstests können verminderte hCG-Konzentrationsmessungen während der Extrauterin gravidität (Eileiterschwangerschaft) oder hCG-Titer bei Patientinnen nach IUD-Binlage nur unzureichend unter dem Aspekt veränderten uterinen Sekretionsverhaltens bewertet werden (38, 39).

Als „Phantom hCG“ bezeichnet man ein Phänomen, bei dem ein Schwangerschaftstest im Blut positiv für hCG ist, obwohl keine Schwangerschaft oder ein Tumor im Genitaltrakt vorliegt. Bei der heutigen Diskussion der Phantom hCG Werte geht man davon aus, dass dieses Phänomen auf eine abnormale Interaktion zwischen dem Test und in der Blutprobe der Patientin enthaltenen irregulären Antikörper zurückzuführen ist (54).

Aufgabe der Erfindung ist es, Verfahren und Mittel anzugeben, welche es ermöglichen, definierte Zustände bzw. Veränderungen in der Uterusschleimhaut (Endometrium, Dezidua), aber auch in den Epithelien anderer Organe zu ermitteln. Das Verfahren und die Mittel sollen insbesondere das Feststellen optimaler Implantationsbedingungen im Uterus und eine zuverlässige Diagnostik der Schwangerschaft und deren Störung sowie des Geburtsbeginnes ermöglichen.

Der Erfindung liegt die wissenschaftliche Erkenntnis zugrunde, dass im endometrialen und dem dezidualen Epithel β hCG-Untereinheiten exprimiert werden, welche sich in mehreren Aminosäure-Positionen von den bekannten trophoblastären β hCG-Untereinheiten unterscheiden.

Die Nukleotidsequenz und Proteinsequenz für die endometriale β hCG-Untereinheit wird hier erstmals in SEQ ID No 7 und SEQ ID No 10 dargestellt (e β hCG oder „Endo“).

Die im endometrialen und dem dezidualen Epithel exprimierten β hCG-Untereinheiten werden nachfolgend als endometriales β hCG (e β hCG) bezeichnet. Unsere Ergebnisse zeigen, dass das e β hCG eine endometriale Variante der Untereinheiten β 7 und β 6 darstellt, während trophoblastäres β hCG ausschließlich aus den Untereinheiten β 5, β 8 und β 3 gebildet wird.

Gefunden wurden folgende Unterschiede des e β hCG zum bekannten trophoblastären β hCG (t β hCG):

Eine Variation von Aspartat (t β hCG) in der Aminosäureposition 117 des C-terminalen Endes von β hCG (β hCG-CTP) zu Alanin (e β hCG).

Weitere Variationen wurden in Position 2 und Position 4 des Exon 2 gefunden. Das trophoblastäre β hCG (t β hCG) hat an Position 2 ein Lysin und an Position 4 ein Prolin. Das endometriale β hCG (e β hCG) hat an Position 2 ein Arginin und an Position 4 ein Methionin.

Unter endometrialem β hCG (e β hCG) wird nachfolgend ein β hCG verstanden, welches zumindest eine der zuvor genannten Variationen aufweist.

In Fig. 1 wird ein Alignment der Sequenz des e β hCG („Endo“) mit den Sequenzen der trophoblastären β hCG-Untereinheit t β hCG β 5 und den bekannten nicht-trophoblastären β hCG-Untereinheiten β 6 und β 7, sowie des hypophysären β LH β 4 (β -Untereinheit des Luthetic Hormon) gezeigt.

Die Nukleotidsequenz des endometrialen e β hCG (SEQ ID No 7) unterscheiden sich auch von den bekannten nicht-trophoblastären β hCG-Untereinheiten β 7 (SEQ ID No 5) und β 6 (SEQ ID No 6), insbesondere im Promotorgen des Exon 1, aber auch in Exon 2 am Expressionsort der Aminosäureposition 2 und 4 (Fig. 1). In der nach Genexpression resultierenden Aminosäuresequenz (SEQ ID No 10) repräsentiert sich das endometriale e β hCG als Variante des epithelialen Typ I- β hCG des β hCG β 7-Proteins (SEQ ID No 9) mit drei differierenden Aminosäuren an Position 2, 4 und 117 zwischen dem endometrialen respektive dezidualem e β hCG und dem herkömmlichen trophoblastären t β hCG (SEQ ID No 8). Die Aminosäuresequenz des endometrialen e β hCG (SEQ ID No 10) differiert zur Sequenz des hypophysären β LH β 4 (SEQ ID No 11) beträchtlich (Fig. 1).

Weiterhin beruht die Erfindung auf der wissenschaftlichen Erkenntnis, dass die Ursache für die falsch positiven Ergebnisse, der aus dem Stand der Technik bekannten Tests ist, dass sie nicht zwischen den trophoblastären Sekretionsleistungen des Embryos in Form von t β hCG und den Sekretionsleistungen die mit der sekretorischen Transformation und uterinen Dezidualisierung des Endometriums sowie bei der Epitheldifferenzierung entstehen (e β hCG) unterscheiden.

Verfahren:

Basierend auf dieser Erkenntnis wird erfindungsgemäß die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zur Bestimmung von definierten Zuständen oder Veränderungen in der Uterusschleimhaut oder im Epithel anderer Organe, bei dem in einer Körperflüssigkeitsprobe und/oder Gewebeprobe die Konzentration von endometrialem β hCG bzw. nicht-trophoblastärem β hCG spezifisch bestimmt wird. Unter spezifischer e β hCG-Bestimmung wird dabei verstanden, dass zwischen endometrialem β hCG und trophoblastärem β hCG unterschieden wird.

Die Bestimmung der Konzentration erfolgt bevorzugt in einer Probe (in Form von Sekreten, Perfusionsflüssigkeit, Zellen oder Gewebe) aus peripheren Blut, Serum, Menstrualblut, Lochia, Fruchtwasser, Urin, Speichel, Augenkammerwasser sowie Sekreten des Urogenital- (incl. Uterus, Zervix, Vaginalproben), des Gastrointestinal- (incl. Mundschleimhaut) und des Respirationstraktes sowie des zentralen Nervensystems (incl. Liquor).

Bevorzugt wird im erfindungsgemäßen Verfahren, neben der Konzentration von endometrialem β hCG bzw. nicht-trophoblastärem β hCG auch die Konzentration von trophoblastärem β hCG (t β hCG), Gesamt- β hCG oder Gesamt-hCG bestimmt.

Die Bestimmung von trophoblastärem β hCG (t β hCG), Gesamt- β hCG, oder GesamthCG erfolgt bevorzugt nach bekannten Methoden (18, 19, 21, 22, 23,, 24, 29, 30, 31, 54).

Da diese bisher bekannten Methoden nicht zwischen t β hCG und ehCG unterscheiden, ermöglicht die erfindungsgemäße spezifische Bestimmung des e β hCG erstmals auch eine Aussage darüber, ob das mit diesen Tests bestimmte t β hCG tatsächlich t β hCG ist, und wie hoch der Anteil an t β hCG und e β hCG ist.

Der Anteil des t β hCG ergibt sich aus der Konzentration des Gesamt-hCG / β hCG oder GesamthCG abzüglich des gemessenen e β hCG bzw. nicht-trophoblastären β hCGs.

Vorteilhaft eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren insbesondere zur Diagnose der Aufnahmebereitschaft (Rezeptivität) der Uterusschleimhaut für eine befruchtete Eizelle und ermöglicht damit das Feststellen optimaler Implantationsbedingungen im Uterus.

Es wurde nun festgestellt, dass die Expression von eßhCG in der Uterusschleimhaut (Endometrium) nötig ist, um das erfolgreiche Binnisten einer befruchteten Eizelle zu ermöglichen. Eine beginnende eßhCG-Expression oder eine ehCG ist ein Zeichen für die Aufnahmebereitschaft der Uterusschleimhaut für eine befruchtete Eizelle.

Die Diagnose der Aufnahmebereitschaft der Uterusschleimhaut (Implantationsbedingung) für eine befruchtete Eizelle erfolgt bevorzugt prospektiv, in dem einer Patientin in der frühen Lutealphase Gewebe vom Endometrium oder von der Zervixschleimhaut (Mundschleimhaut), Vaginal-, Zervix- oder Uterussekret oder Serum, Plasma und Peripherblut entnommen wird und in dieser Probe die nicht-trophoblastäre oder endometriale ßhCG-Konzentration bestimmt wird. Aus der Höhe der ermittelten Expression können dann Rückschlüsse auf die Aufnahmebereitschaft der Gebärmutter für einen Embryo im aktuellen oder prognostische Aussagen für den Folgezyklus getroffen werden.

Dazu werden bevorzugt einige Tage nach der Ovulation Zellen mit einem Minikatheter aus der Gebärmutterhöhle, mit einem Wattebausch aus dem Zervikalkanal oder mit einem Holzspatel von der Mundschleimhaut gewonnen bzw. peripheres BDTA- bzw. Heparinblut entnommen. In den aufgenommenen Zellen wird die nicht-trophoblastäre oder endometriale ßhCG-Konzentration bestimmt.

Für die prospektive Diagnostik der Embryorezeptivität in der frühen Sekretionsphase des aktuellen Zyklus werden bevorzugt Gewebeproben des Endometriums, aus der Endocervix, der Mundschleimhaut oder anderer ausgewählter Epithelien wie auch Cervix-/ Vaginalsekret oder endometriales Sekret nach Abstrich oder als Perfusat untersucht, um über die Qualität der zu erwartenden sekretorischen Transformation und Rezeptivität des Endometriums (z. B. für die Entscheidung eines Embryotransfers nach In-vitro-Fertilisation im hormonell stimulierten Zyklus) zu befinden.

Über die Aussage der Implantationsbedingungen im vorausgegangenen Zyklus lassen sich Prognosen über die Implantationsbedingungen, d. h. die Aufnahmebereitschaft der Gebärmutter für eine befruchtete Eizelle oder einen Embryo, im Folgezyklus machen.

Eine weitere bevorzugte Verwendung des Verfahrens ist daher die Anwendung zur retrospektiven Diagnostik der Rezeptivität der Uterusschleimhaut. Unter retrospektiven Implantationsdiagnostik wird im Sinne der vorliegenden Erfindung verstanden, die sekretorische Transformation des Endometriums des vorangegangenen Zyklus zu detektieren um Voraussagen für die Rezeptivität eines folgenden Zyklus zu treffen. Diese lassen eine ungestörte zeit- und funktionsgerechte Eierstocks-Gebärmutter-Beziehung erkennen.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann damit die invasive Methode der Strichabrasio in ihrer Aussage ergänzen oder ersetzen.

Mit der Bewertung und Quantifizierung der spezifischen epithelialen endometrialen hCG-Sekretion (ehCG) in Körperflüssigkeiten und Zell-(Gewebe-)homogenaten der frühen, mittleren und späten Sekretionsphase des menstruellen Zyklus können optimale Implantationsbedingungen wie auch mögliche Fertilisationsstörungen sowohl prospektiv als auch retrospektiv unter dem Aspekt der endometrialen Diagnostik und Therapiekontrolle erfasst werden.

Bei der retrospektiven Diagnostik der Rezeptivität der Uterusschleimhaut kann prinzipiell, wie zur prospektiven (vorbereitenden) Implantationsdiagnostik verfahren werden. Bevorzugt erfolgt die Analyse der β hCG-Konzentration jedoch in einer Probe von Menstrualblut oder einer Probe von im Menstrualblut enthaltenen Zellen.

Im Menstrualblut sind ausreichend Zellen des Endometrium vorhanden, die eine Bestimmung der β hCG-Konzentration ermöglichen.

Der Vorteil der retrospektiven Diagnostik im Menstrualblut gegenüber der zuvor beschriebenen prospektiven Methode, liegt darin, dass sie nicht invasiv ist. Es muss weder Peripherblut noch eine Gewebeprobe aus der Gebärmutter entnommen werden. Trotzdem kann mit dieser Methode eine zeit- und funktionsgerechte Umwandlung des Endometriums in der Sekretionsphase des Zyklus erkannt werden, was gleichzeitig Ausdruck einer ungestörten Regulationsfunktion auf den Ebenen Hypothalamus/Hypophyse, Eierstock und Uterus ist.

Menstrualblut kann wie Peripherblut nach Zentrifugation zur Abtrennung von Zellen und Stroma für die direkte Messung der endometrialen β hCG-Sekretion mit spezifischen Antikörpern im ELISA-Test eingesetzt werden. Das Menstrualblut wird nach spontanem Zyklus, nach Hormontherapie, nach In vitro-Fertilisation (IVF) und Embryotransfer (ET) ohne erfolgreiche Implantation sowie bei vorgesehener Diagnostik des Zyklus bei Kinderwunschpatientinnen und bei Patientinnen mit gynäkologischen Erkrankungen wie Myom, Endometriose, Endometrium- und Cervixkarzinom gewonnen. Dabei ist die parallele Gewinnung von Peripherblut zum selben Zeitpunkt als Heparinblut oder als Serum zum Ausschluss eines erhöhten unspezifischen Serum-hCG-Wertes unbedingt erforderlich.

Ist die Konzentration des e β hCG bzw. nicht-trophoblastären β hCG im Menstrualblut gegenüber der Konzentration im Peripherblut erhöht, kann von einer lokalen Bildung im Endometrium ausgegangen werden. Eine hohe e β hCG Konzentration ist dabei Ausdruck einer physiologischen und eine fehlende oder niedrige e β hCG Konzentration Ausdruck einer pathologischen Funktion des Endometriums. Da im Peripherblut kein t β hCG enthalten ist kann für die Bestimmung im Peripherblut allein ein üblicher β -hCG-Nachweis (ELISA, MBIA u. a. - Literaturstellen 18, 19, 21, 22, 23, 24, 28, 29, 30, 54), der nicht zwischen t β hCG und e β hCG unterscheidet, verwendet werden.

Bei der prospektiven oder der retrospektiven Diagnose der Aufnahmbereitschaft der Uterusschleimhaut ist eine Unterscheidung zwischen endometrialen und trophoblastären β hCG nicht zwingend notwendig, da noch keine Schwangerschaft vorliegt und damit eine Expression von t β hCG durch einen Trophoblasten ausgeschlossen werden kann. Die Erfindung umfasst daher auch die Verwendung eines Verfahrens bei dem die Konzentration an Gesamt-hCG / β hCG oder Gesamt- β hCG zur Diagnose der Aufnahmbereitschaft der Uterusschleimhaut für eine befruchtete Eizelle bestimmt wird. Bei diesem Verfahren erfolgt die Bestimmung von hCG bevorzugt mit Antikörpern, die $\alpha\beta$ hCG die bekannten β 7, β 6 oder β 6e hCG-Untereinheiten erkennen. Diese Antikörper müssen nicht spezifisch für e β hCG sein, d.h. sie können auch t β hCG erkennen.

Als derartiger Antikörper wird bevorzugt ein bekannter polyklonaler oder monoklonaler anti- $\alpha\beta$ hCG oder ein anti- β hCG-Antikörper verwendet. Dieser Antikörper erkennt bevorzugt ein

Epitop ausgewählt aus der Gruppe der Epitope $\beta 1$ bis $\beta 9$ (besonders bevorzugt $\beta 2$ bis $\beta 8$) der βhCG -Untereinheit, der Epitope $cf\beta 1$ bis $cf\beta 13$ auf dem βhCG -core Fragment und der konformationsabhängigen Epitope $\alpha\beta 1$ bis $\alpha\beta 4$ des intakten $\alpha\beta$ -Heterodimers nach der Klassifizierung der „International Society of Oncodevelopmental Biology and Medicine“ (ISOBM) (18-20). Bezogen werden können derartige Antikörper beispielsweise von der Firma BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland oder Serotec Düsseldorf, Deutschland.

Die Diagnose der Aufnahmebereitschaft der Uterusschleimhaut für eine befruchtete Eizelle wird bevorzugt retrospektiv mit einer Probe von Menstrualblut oder einer Probe von im Menstrualblut enthaltenen Zellen durchgeführt. In der parallelen Abnahme des Peripherblutes ist der gemessene hCG-Wert vernachlässigbar klein zum hCG-Wert im Menstrualblut.

Während der Menstruation kann eine Schwangerschaft und damit eine Expression von $tfhCG$ durch einen Trophoblasten ausgeschlossen werden. Eine Unterscheidung zwischen $efhCG$ und $tfhCG$ kann daher im Menstrualblut auch ohne spezifischen $efhCG$ -Nachweis erfolgen.

Die Erfindung umfasst daher auch ein Verfahren zur Bestimmung von definierten Zuständen oder Veränderungen in der Uterusschleimhaut oder im Epithel anderer Organe, bei dem die Bestimmung der Gesamt-hCG-, βhCG - oder GesamthCG / - βhCG -Konzentration wie oben beschrieben in einer Probe aus Menstrualblut erfolgt.

Entgegen der allgemeinen Auffassung ist nicht $tfhCG$ das erste in der Frühschwangerschaft nachgewiesene βhCG , sondern endometriales oder deziduales $efhCG$.

Vorteilhaft eignet sich damit das erfindungsgemäße Verfahren auch dazu, die Aussagekraft bestehender Schwangerschaftstests zu verbessern. In den bekannten Schwangerschaftstests wird nur das βhCG bestimmt, welches vom Trophoblasten gebildet wird, bzw. unspezifisch Gesamt- βhCG bestimmt. Da $ehCG$ bereits in der gut ausgebildeten Sekretionsphase des Endometriums gebildet wird und mit der Embryoimplantation das deziduale hCG verstärkt freisetzt wird, ist es mit dem erfindungsgemäßen Verfahren möglich, zu einem früheren Zeitpunkt eine Schwangerschaftsdiagnose zu stellen, da hierbei durch die frühen Schwangerschaftsabläufe das $ehCG$ nicht wie bei einer Menstruation nach außen sondern durch einen Flowum in den Blutkreislauf abgegeben wird.

Da die bekannten Tests auch keine Aussage darüber machen, ob der Trophoblast sich erfolgreich in die Gebärmutter eingenistet hat, führen sie häufig zu falsch positiven Ergebnissen.

Im Unterschied zu den bekannten Schwangerschaftstests, in denen die Heterogenität des β hCG nicht berücksichtigt wird, wird erfindungsgemäß die Konzentration von endometrialem β hCG bzw. nicht-trophoblastärem β hCG spezifisch bestimmt. Dies ermöglicht eine Aussage über die Sekretionsleistung und Rezeptivität der Uterusschleimhaut, welche Voraussetzung für eine erfolgreiche Schwangerschaft ist. Das erfindungsgemäße Verfahren führt daher zu einer zuverlässigeren Schwangerschaftsdiagnose gegenüber den bekannten Verfahren. Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht auch die Unterscheidung zwischen einer Extrauterin gravidität oder eines frühen Schwangerschaftsverlusts und einer intrauterinen Schwangerschaft. Bei einer intrauterinen Implantation des Embryos ist die Expression von e β hCG höher, als bei einer extrauterinen Implantation. Die Diagnose einer Extrauterin gravidität erfolgt bevorzugt durch Analyse einer Serumprobe. Eine niedrige Konzentration von e β hCG im Serum bei normalem t β hCG ist ein Zeichen für eine Extrauterin gravidität. Bei einem frühen Schwangerschaftsverlust ist e β hCG vorhanden, es fehlt jedoch eine t β hCG-Expression.

Bevorzugt wird zur Schwangerschaftsdiagnose, neben der Konzentration von endometrialem β hCG bzw. nicht-trophoblastärem β hCG auch die Konzentration von trophoblastärem β hCG (t β hCG), Gesamt- β hCG oder GesamthCG nach den oben genannten bekannten Methoden bestimmt.

Die erfindungsgemäße spezifische Bestimmung des e β hCG ermöglicht erstmals auch eine Aussage darüber, ob das mit den bekannten Methoden bestimmte β hCG tatsächlich t β hCG ist, und wie hoch der Anteil an t β hCG und e β hCG ist. Damit kann erstmals sicher diagnostiziert werden, ob eine Schwangerschaft tatsächlich vorliegt oder nicht. Eine Schwangerschaft ist dann vorhanden, wenn sicher thCG nachgewiesen werden kann. Da ehCG epithelialen Ursprunges ist und von der Frau stammt, ist ein kurzfristiger mit nach dem Stand der Technik durchgeführter hCG Nachweis bei ausgebliebener Regelblutung nicht gleichbedeutend mit einer Frühschwangerschaft. Nach dem Stand der Technik werden häufig frühe Schwangerschaftsverluste als Schwangerschaft fehlinterpretiert. Gleiches gilt für den nach dem Stand der

Technik durchgeführter hCG Nachweis in der zweiten Zyklushälfte bei Trägerinnen einer Kupferspirale (Cu-IUD). Auch hier besteht keine Schwangerschaft, sondern das alterierte Endometrium reagiert mit einer ehCG Freisetzung.

Mit der differenzierten Bestimmung der Konzentration des ehCG und deren Relation zu thCG kann erstmals auch diagnostisch unterschieden werden, ob eine Schwangerschaftsstörung bedingt ist durch eine Veränderung der Dezidua oder der trophoblastären-embryonale/fetalen Einheit.

Das erfindungsgemäße Verfahren eröffnet auch die Möglichkeiten, die Schwangerschaft während ihres Verlaufs zu überwachen und eine Aussage über mögliche Schwangerschaftsstörungen bzw. den Erfolg einer Schwangerschaft zu machen.

Eine ungestörte Schwangerschaft ist gekennzeichnet durch hohe ehCG Werte im Peripherblut und in Proben des Genitaltraktes (Abstrich, Sekret, Gewebe). Bei erniedrigten ehCG Werten besteht eine Abortneigung. Durch das Verfahren kann eine Abortneigung frühzeitig diagnostiziert werden und umgehend eine Therapie eingeleitet werden. Danach kann das Verfahren zur Therapiekontrolle eingesetzt werden. Dabei ermöglicht das erfindungsgemäße Verfahren vorteilhaft die Differenzierung zwischen einer Störung der Dezidua von einer trophoblastären/embryonalen Störung bei beginnendem Abort. Bei einer trophoblastären/embryonalen Störung ist das tßhCG erniedrigt.

Auch andere Schwangerschaftsstörungen wie intrauterine Wachstumsretardierung und Präeklampsie zeigen unphysiologische, d. h. erniedrigte, ehCG Werte, welche mit dem erfindungsgemäßen Verfahren diagnostiziert werden können.

Die Bestimmung des ehCG im Serum und aus Proben des Genitaltraktes (Abstrich, Sekret, Gewebe) kann vorteilhaft für das Frühgeburtscreening und die Bestimmung des Geburtsbeginns eingesetzt werden. Erhöhte eßhCG-Werte in Sekreten des Urogenitaltrakts, insbesondere Vaginal- und Zervikalsekreten, und erniedrigte Werte im Serum zeigen eine Frühgeburt bzw. am Ende der Schwangerschaft den Geburtsbeginn an.

Die spezifische Bestimmung der ehCG Konzentration im Fruchtwasser ermöglicht vorteilhaft die Diagnostik der Deziduafunktion während der Schwangerschaft. Nach der Geburt kann die

Dezidua-Funktion vorteilhaft auch durch spezifische Bestimmung der ehCG Konzentration in der Lochia nachträglich bestimmt werden. Eine hohe eßhCG-Konzentration ist in beiden Fällen ein Zeichen für eine gesunde Funktion der Dezidua. Eine verminderte tßhCG-Konzentration ist jedoch ein Hinweis auf eine Schwangerschaftspathologie.

Das erfindungsgemäße Verfahren der spezifischen Bestimmung von eßhCG bzw. nicht-trophoblastären ßhCG, eignet sich auch zur Beurteilung der Effektivität einer kontrazeptiven Methode. Ein Ausbleiben, Absinken oder die zeitliche Verschiebung der ehCG-Sekretion ist dabei ein Zeichen für die Qualität der kontrazeptiven Potenz und ermöglicht die Klassifizierung einer Methode.

Dazu wird die eßhCG-Konzentration in Proben (Sekret, Spülflüssigkeit, Zellen, Gewebe) des Endometriums bevorzugt in einem ELISA mit eßhCG-spezifischen Antikörpern bestimmt.

Wird kein eßhCG durch das Endometrium gebildet, ist dies ein Zeichen dafür, dass das Endometrium nicht aufnahmebereit für eine befruchtete Eizelle ist. Es besteht somit Schutz vor einer Schwangerschaft.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann vorteilhaft auch zur Differenzierung zwischen physiologischen und pathologischen Epithelzuständen eingesetzt werden. Dabei signalisiert eine epitheliale ehCG-Expression oder eine Expression von nicht-trophoblastärem ßhCG ($\beta 7$, $\beta 6$) physiologische Verhältnisse, während der Nachweis von tßhCG ($\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$) in einer Zell- oder Gewebeprobe einen Hinweis auf einen pathologischen Epithelprozess, z. B. einen Tumor, eine beginnende Dedifferenzierung oder eine beginnende karzinomatöse Entartung oder ein Karzinom gibt.

Pathologische Epithelprozesse, welche auf diese Weise mit dem erfindungsgemäßen Verfahren insbesondere diagnostiziert werden können, sind Endometriosen, Myome, Schilddrüsenerkrankungen sowie Karzinome des Endometriums, des Eierstocks und des Peritoneums.

Die Bestimmung der eßhCG-Expression und die parallele Bestimmung des Gesamt- hCG /ßhCG oder GesamthCG erfolgt dabei bevorzugt im biologischen Material der Desquamation des endometrialen Gewebes nach Separation der epithelialen Zellen von den Stromazellen,

den peripheren mononukleären Blutzellen und den mononukleären Immunzellen des endometrialen Epithels.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren ist es damit möglich, eine regelrechte Differenzierung epithelialer Organe zu unterscheiden von einer Fehldifferenzierung und beginnenden karzinomatösen Entartung. Dies wird möglich, da auf der Ebene der Transkription und Translation zwischen dem $\beta 7$ hCG und dem tumorspezifischen $\beta 5$ hCG differenziert werden kann. Die Konzentrationen und ihre Relationen beider hCG Typen geben eine Aussage über die Epithelgesundheit bzw. deren Störung im Sinne einer Entdifferenzierung. Auch die bösartige Potenz und die Prognose einer Tumorerkrankung könnte davon abgeleitet werden.

Durch die Erkenntnis, dass hCG auch ein epitheliales Hormon ist, das vom Epithel der inneren Oberfläche sezerniert wird, ist der Nachweis eines hCG im Serum von gesunden, nicht-schwangeren Patientinnen und Patienten ohne Nachweis eines Tumors nicht überraschend. Gegenwärtig wird dieser nicht erklärbare hCG Nachweis bei Patientinnen/Patienten ohne Schwangerschaft und Tumor als das sogenannte „Phantom hCG“ noch mit dem Vorhandensein von irregulären Antikörpern in Verbindung gebracht. Durch das erfindungsgemäße Verfahren der spezifischen Bestimmung von e β hCG bzw. nicht-trophoblastären β hCG können diese Fälle von „Phantom hCG“ als eine physiologische Spielvariante einer epithelialen Funktionsleistung erklärt werden. Durch das erfindungsgemäße Verfahren kann eine physiologisch erhöhte Expression e β hCG bzw. nicht-trophoblastären β hCG ($\beta 7$, $\beta 6$) von einer erhöhten t β hCG ($\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$)-Expression in einem Karzinom unterscheiden werden. Unnötige Chemotherapien und langwierige kostenaufwendige Überwachungen dieser Patienten erübrigen sich somit.

Die Bestimmung der Konzentration von endometrialem β hCG (e β hCG) erfolgt semi-quantitativ oder quantitativ. In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Konzentrationsbestimmung mit mindestens einem Antikörper, der spezifisch e β hCG bzw. nicht trophoblastäres β hCG (t β hCG) erkennt, in einem ELISA, Dotblot-, oder Westernblotassay, in einer immunohistochemischen Methode, Flow-Cytometry, oder in einer anderen benannten Antikörper-basierten Methode. In einer alternativen Ausführungsform erfolgt die Bestimmung der Konzentration von endometrialem β hCG (e β hCG) und die Unterscheidung zu trophoblastärem β hCG auf der Ebene der RNA-Expression, z. B. durch die

bekannten Methoden der RT-PCR, oder z. B. durch die Hybridisierung mit einer Oligonucleotid-Sonde.

Die Erfindung umfasst auch die Antikörper, welche spezifisch eßhCG und nicht tßhCG erkennen. Der Begriff Antikörper im Sinne der vorliegenden Erfindung umfasst dabei neben monoklonalen und polyklonalen Antikörpern auch rekombinante Antikörper und Fragmente, wie z. B. scFv (single-chain-Fragmente) und Fab-Fragmente mit ein. Bevorzugt trägt der Antikörper ein Markermolekül, wie z. B. Biotin, Dioxygenin oder einen Fluoreszenzfarbstoff

Die erfindungsgemäßen eßhCG-spezifischen Antikörper erkennen bevorzugt ein Hexa- bis Decapeptid im Bereich der Aminosäureposition der 117 (SEQ ID No 1) oder im Bereich der Aminosäurepositionen 2 und 4 (SEQ ID No 3) der Sequenz des eßhCG (SEQ ID No 10). Diese eßhCG-spezifischen Epitopbereiche werden eß9 (SEQ ID No 1) und eß1 (SEQ ID No 3) genannt. Aus diesen Epitop-Bereichen erkennen die eßhCG-spezifischen Antikörper ein Epitop, welches Aminosäureposition der 117 bzw. Aminosäurepositionen 2 und 4 umfasst, wie z. B.:

Pro - Arg - Phe - Gln - Ala - Ser - Ser

117

oder:

Ser - Arg - Glu - Met - Leu - Arg - Pro -

2

4

3

Die erfindungsgemäßen eßhCG-spezifischen Antikörper reagieren jedoch nicht mit den entsprechenden tßhCG-Epitopen ß9 und ß1 aus den entsprechenden Bereichen (SEQ ID No.2 und 4) der Sequenz für tßhCG (SEQ ID No. 8), wie z. B.:

Pro - Arg - Phe - Gln - Asp - Ser - Ser

117

Ser - Lys - Glu - Pro - Leu - Arg - Pro -

2

4

Die erfindungsgemäßen Antikörper sind bevorzugt mit einem Peptid ausgewählt aus den Peptidsequenzen gemäß SEQ ID No. 1, 12, sowie 3 und 14 bzw. deren Teilsequenzen generiert und reagieren nicht mit den Kontrollpeptiden für tßhCG gemäß SEQ ID No. 2, 13, sowie 4 und 15.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Testkit zur Bestimmung von definierten Zuständen oder Veränderungen in der Uterusschleimhaut oder im Epithel anderer Organe.

Dieses Testkit enthält mindestens einen Antikörper, welcher spezifisch eßhCG erkennt, sowie gegebenenfalls Stabilisatoren, weitere Antikörper, wie z. B. weitere anti-hCG-Antikörper, sekundäre Antikörper, Standards, Puffer, Reagenzien zum Blockieren freier Bindungsstellen (z. B. Magermilchpulver oder bovines Serumalbumin (BSA)).

Bevorzugt ist in dem diagnostischen Kit der Antikörper, welcher spezifisch eßhCG erkennt, an einen festen Träger gebunden. Ein solcher fester Träger ist z. B. eine ELISA-Platte, bevorzugt aus Polycarbonat, oder im Falle des Dotblot- oder Westernblot-Assays eine Folie, bevorzugt aus Nitrozellulose.

Die Bindung des Antikörpers an eine ELISA-Platte ermöglicht vorteilhaft die Durchführung eines Sandwich-ELISAs, in dem das Binden des eßhCG an den eßhCG-spezifischen Antikörper durch einen zweiten anti-hCG-Antikörper detektiert wird. Die Bindung des Antikörpers an eine ELISA-Platte wird z. B. durch Inkubieren der Platte mit einer Antikörperlösung in 50 mmol/Liter Carbonat bei einem pH-Wert von pH 8 bis pH 9 für mindestens eine Stunde und anschließendes Trocknen erreicht.

Als zweiter anti-hCG-Antikörper wird bevorzugt ein polyklonaler oder monoklonaler anti- $\alpha\beta$ hCG oder β hCG-Antikörper verwendet, der im Unterschied zu den erfindungsgemäßen eßhCG-spezifischen Antikörpern sowohl das endometriale als auch trophoblastäre hCG erkennt. Dieser Antikörper erkennt bevorzugt ein Epitop, ausgewählt aus der Gruppe der Epitope β 1 bis β 9 (besonders bevorzugt β 2 bis β 8) der β hCG-Untereinheit der Epitope cf β 1 bis cf β 13 auf dem β hCG-core Fragment und der konformationsabhängigen Epitope $\alpha\beta$ 1 bis $\alpha\beta$ 4 des intakten $\alpha\beta$ -Heterodimers der Klassifizierung der „International Society of Oncodevelopmental Biology and Medicine“ (ISOBM) (18-20). Bezogen werden können derartige

Antikörper beispielsweise von der Firma BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland oder Serotec Düsseldorf, Deutschland.

Als Standard für eßhCG bzw. als Negativkontrolle für tßhCG sind in dem Testkit bevorzugt eßhCG, oder Peptide mit einer Aminosäuresequenz aus sechs bis 15 Aminosäuren aus dem im Bereich der Aminosäureposition 2 und 4 bzw. im Bereich der Aminosäureposition der 117 der Sequenz des eßhCG (SEQ ID No 7), d. h. der Eptope eß1 bzw. eß9, vorzugsweise Peptide der SEQ ID No. 1, 12, 3, 14 bzw. deren Teilsequenzen deren Lösungen enthalten.

Als Standard für tßhCG bzw. als Negativkontrolle für eßhCG sind in dem Testkit bevorzugt tßhCG, oder Peptide mit einer Aminosäuresequenz aus sechs- bis 15 Aminosäuren aus dem im Bereich der Aminosäureposition 2 und 4 oder im Bereich der Aminosäureposition der 117 der Sequenz des tßhCG (SEQ ID No 8), d. h. der Eptope ß1 bzw. ß9, vorzugsweise Peptide der SEQ ID No. 2, 13, 4, 15 bzw. deren Teilsequenzen deren Lösungen enthalten.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind die isolierte endometriale β -Untereinheit (eßhCG) von humanen Choriongonadotropin (eßhCG) mit der Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No. 10 und die isolierte Gensequenz für eßhCG gemäß SEQ ID No 7 und die Verwendung der Sequenzen als Marker für die Schwangerschaftsdiagnose oder zur Diagnose der Aufnahmebereitschaft der Uterusschleimhaut für eine befruchtete Eizelle. Gegenstand der Erfindung sind auch die isolierten Peptidsequenzen gemäß SEQ ID No. 1, 3 12 und 14.

Die Erfindung umfasst auch die Verwendung der erfindungsgemäßen eßhCG spezifischen Antikörper, der isolierten Peptidsequenzen gemäß SEQ ID No. 1, 3 12 bzw. 14 und des erfindungsgemäßen Testkits zur Schwangerschaftsdiagnose oder zur Diagnose der Aufnahmebereitschaft der Uterusschleimhaut für eine befruchtete Eizelle.

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Ausführungsbeispiele näher erläutert, ohne auf diese beschränkt zu sein:

Ausführungsbeispiel 1: Gewinnung eines polyklonalen Antikörpers spezifisch für das epitheliale endometriale hCG-Molekül (eβhCG) zum βhCG-Epitop β9 am C-terminalen Ende (AS 109-123).

Ausführungsbeispiel 2: Gewinnung eines Antikörpers spezifisch für das epitheliale endometriale hCG-Molekül (eβhCG) zum βhCG-Epitop β1 (AS 1-15).

Ausführungsbeispiel 3: Generierung von monoklonalen Antikörpern.

Ausführungsbeispiel 4: Verfahren zum Nachweis des eβhCG in Körperflüssigkeiten und Gewebekomogenaten mittels ELISA.

Ausführungsbeispiel 5: Zusammensetzung eines Testkits zum Nachweis des eβhCG in Körperflüssigkeiten und Gewebekomogenaten mittels ELISA.

Ausführungsbeispiel 6: Verfahren zur Feststellung optimaler Implantationsbedingungen durch die Bestimmung von endometrialem hCG.

Ausführungsbeispiel 7: Verfahren zum Feststellen von physiologischen Endometriumszuständen und zur Erfassung von Fertilisationsstörungen im menstruellen Zyklus durch die Bestimmung von ehCG.

Ausführungsbeispiel 8: Verfahren zur retrograden Beurteilung optimaler Implantationsbedingungen durch die Bestimmung von endometrialem hCG im Menstrualblut.

Ausführungsbeispiel 9: Verfahren zur Diagnostik für eine Differenzierung zwischen mütterlich-dezidualen vs. embryonal-trophoblastären Störungen bei Abortneigung und beginnendem Abort.

Ausführungsbeispiel 10: Verfahren zum Frühgeburtsscreening bzw. zur Diagnostik des Geburtsbeginnes.

Ausführungsbeispiel 1:

Für die Gewinnung von Antikörpern, die spezifisch das endometrial und dezidual translatierte eßhCG gemäß SEQ ID No 10 erkennen, wird in diesem Ausführungsbeispiel das folgende Dekapeptid (SEQ ID No. 12) als Antigen mit hoher Antigenizität aus dem für die Antikörpergewinnung zum eßhCG-Epitop eß9 in der Erfindung empfohlenen Aminosäuresequenzbereich (SEQ ID No. 1) verwendet:

P1: Cys - Asp - Asp - Pro - Arg - Phe - Gln - Ala - Ser - Ser (SEQ ID No. 12)

Dieses P1 ist ein synthetisches Peptid mit 10 Aminosäuren (AS) aus der Aminosäuresequenz 109 - 123 des Exon 3 der endometrialen Variante des $\beta 7$ - und $\beta 6$ -Gen. Dieses Peptid unterscheidet sich vom bekannten, dem C-terminalen Peptid (CTP- β hCG) nahen Epitop $\beta 9$ der trophoblastären β hCG-Untereinheit durch ein Alanin (Ala) - statt Aspartat (Asp) - an Position 8 des Peptids (Aminosäureposition 117 im β hCG). Die ausgewählte Aminosäuresequenz unterscheidet sich beträchtlich von der Sequenz der β LH-Untereinheit (SEQ ID No. 11). Alternativ können auch andere Peptide mit 7 bis 15 Aminosäuren aus dem Sequenzbereich aus dem Aminosäuresequenzbereich eßhCG-Epitop eß9 (SEQ ID No. 1) verwendet werden, welche ein Alanin (Ala) an der Position aufweisen, die der Aminosäureposition 117 im eßhCG (SEQ ID No 10) entspricht.

Zur Gewinnung von Kontroll-Antikörpern, die spezifisch die $\beta 5$, $\beta 8$, $\beta 3$ - Untereinheiten des bekannten trophoblastären hCG (thCG) (SEQ ID No 8) erkennen, wird in diesem Ausführungsbeispiel das folgende synthetische Dekapeptid (SEQ ID No 13) als Antigen mit hoher Antigenizität aus dem für die Antikörpergewinnung zum β hCG-Epitop $\beta 9$ in der Erfindung empfohlenen Aminosäuresequenzbereich (SEQ ID No. 2) im Epitop $\beta 9$ nahe dem CTP- β hCG eingesetzt:

K1: Cys - Asp - Asp - Pro - Arg - Phe - Gln - Asp - Ser - Ser (SEQ ID No. 13)

Die Peptide P1 und K1 wurden durch konventionelle Solid-phase-Peptidsynthese hergestellt, durch Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie gereinigt und durch HPLC spezifiziert (23, 49).

Die aus dem in der Erfindung empfohlenen Aminosäuresequenzbereich für das β hCG-Epitop β 9 in diesem Ausführungsbeispiel ausgewählten Peptide P1 und K1 werden mit dem BZ Antibody Production and Purification Kit, Carboxyle reactive (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) nach der Herstellervorschrift an das Protein keyhole limpet hemocyanin (KLH) als Carrier gebunden (53). Nach der entsprechenden Vorschrift wurden die Peptide für den nachfolgend beschriebenen ELISA an Bovine Serumalbumin (BSA) als Carrier gebunden.

Für die Herstellung polyklonaler Antikörper werden fünf 12 Wochen alten Kaninchen (New Zealand White, jeweils circa 2 kg im Gewicht) verschiedene Lösungen mit einem Gesamtvolumen von jeweils 500 μ l i. p. injiziert. Kaninchen #1 erhält 200 μ g KLH-gebundenes Peptid P1 in 0,1% NaCl mit 1:1 Adjuvanz Specol (ID-DLO, Lelystad), Kaninchen #2 erhält 500 μ g KLH-gebundenes Peptid K1 in 0,1% NaCl mit 1:1 Adjuvanz Specol, Kaninchen #3 erhielt nur 0,1% NaCl mit 1:1 Adjuvanz Specol. 14 Tage später wird die Injektion mit jeweils der gleichen Lösung i. p. wiederholt (Boosterung). Eine letzte Boosterung erfolgt 3 Wochen nach der ersten Boosterung mit der gleichen Lösung. 14 Tage nach der letzten Boosterung werden Seren entnommen. Die Seren werden in einem ELISA nach Standardbedingungen auf das Vorhandensein spezifischer Antikörper gegen P1 untersucht.

Für den ELISA wurde das BSA-gebundene Peptid P1 zunächst in einer Konzentration von 10 μ g/ml in einem Beschichtungspuffer (0,1 mol/Liter Natriumcarbonat/Bicarbonat, pH 9,6) in 50 μ l/Vertiefung auf eine MaxiSorp ELISA-Platte (Nunc) aufgebracht und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Parallel dazu wurde eine Platte (=Negativ-Kontrollplatte) entsprechend mit einer Lösung des BSA-gebundenen Kontrollpeptids K1 beschichtet. Die Vertiefungen wurden anschließend fünfmal mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung mit Zusatz von 0,1 % Tween 20 (PBS-T) gewaschen. Dann wurden jeweils 200 μ l einer 10%-igen Milchpulver-Lösung in PBS-T zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert und einmal mit PBS-T gewaschen. Die so vorbereiteten Platten wurden mit den Immunseren inkubiert, 3 x mit PBS-T gewaschen und 0,5 h mit einem biotinylierten Anti-Kaninchen-IgG (Dako) als sekundärem Antikörper inkubiert und dreimal mit PBS-T gewaschen.

Anschließend wurde eine 1:2000 Verdünnung eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugats (Sigma) in PBS-T zugegeben. Nach 30minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Platte zweimal mit PBS-T und einmal mit PBS gewaschen und ein Substrat (100 µl), das o-Phenyldiaminhydrochlorid enthielt, zugegeben. Die gelbbraune Farbentwicklung wurde nach 5 Minuten durch Zugabe von 50 µl 2M H₂SO₄ gestoppt und die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 490 nm (Referenz-Wellenlänge: 650 nm) bestimmt.

Hierbei konnten P1-spezifische Antikörper nur bei Kaninchen #1 bei den Seren, die ab dem 7. Tag nach Injektion gewonnen worden waren, nicht jedoch bei den Seren vor der Injektion sowie bei keinem Serum von Kaninchen #2 und #3 detektiert werden. Diese Versuche demonstrieren, dass das Peptid P1 in der Lage ist, spezifische Antikörper in Kaninchen zu induzieren.

Zur immunaффinitätschromatographischen Aufreinigung der Antikörper aus dem Serum wird das Peptid P1 entsprechend der Herstellervorschrift des EZTM Antibody Production and Purification Kits, Carboxyle reaktive (Pierce) an eine Diaminodipropylamine-Säule immobilisiert (53). Das Serum, aus dem die spezifischen Antikörper gereinigt werden sollten, wurde zur Inaktivierung für 30 Minuten bei 56 °C inkubiert. Danach wurde es auf die Säule gegeben und lief hindurch. Anschließend wurde die Säule mit 20 ml PBS und mit 10 ml einer 0.5 Mol/Liter MgCl₂-Lösung gewaschen. Die Elution der spezifisch gebundenen Antikörper erfolgte durch Zugabe von 3 ml 3 Mol/Liter MgCl₂, gefolgt von 3 ml 4 Mol/Liter MgCl₂. Die Eluate wurden in Dialyse-Schläuche (Pierce) gegeben und über Nacht bei 4 °C gegen 1 Liter PBS dialysiert. Anschließend wurde der Proteingehalt der dialysierten Präparationen mittels des BCA-Protein-Kits (Pierce) bestimmt, die Reinheit durch SDS-PAGE und Coomassie-blue-Färbung sowie die Spezifität der Antikörper-Präparationen mittels ELISA nachgewiesen.

Ausführungsbeispiel 2:

Auch für die weiteren Aminosäuredifferenzen zwischen tβhCG und eβhCG im βhCG-Epitopabschnitt β1 in den Aminosäurepositionen +2 (Lys zu Arg) und +4 (Pro zu Met) wird ein eβhCG-spezifischer Antikörper und ein tβhCG-spezifischer Kontroll-Antikörper hergestellt.

Zur Generierung von Antikörpern, die spezifisch das endometrial und dezidual translatierte eβhCG gemäß SEQ ID No 10 erkennen, wird in diesem Ausführungsbeispiel das folgende

synthetische Peptid (SEQ ID No. 14) als Antigen mit hoher Antigenizität aus dem für die Antikörpergewinnung zum β hCG-Epitop e β 1 in der Erfindung empfohlenen Aminosäuresequenzbereich (SEQ ID No. 3) verwendet:

P2: Ser - Arg - Glu - Met - Leu - Arg - Pro - Arg - Cys - Arg - Pro (SEQ ID No. 14)

Dieses P2 ist ein synthetisches Peptid aus dem Aminosäuresequenzbereich 1-15 im Exon 2, das sich vom bekannten Epitop β 1 der trophoblastären β hCG-Untereinheit in zwei Aminosäurepositionen unterscheidet. Die ausgewählte Aminosäuresequenz P2 unterscheidet sich in diesem Epitop-Abschnitt auch beträchtlich von der Sequenz der β LH-Untereinheit (SEQ ID No. 11). Alternativ können auch andere Peptide mit 7 bis 15 Aminosäuren aus dem Sequenzbereich aus dem Aminosäuresequenzbereich e β hCG-Epitop e β 1 (SEQ ID No. 3) verwendet werden, welche ein Argenin (Arg) und ein methionin (Met) an den Positionen aufweisen, die den Aminosäurepositionen 2 und 4 im e β hCG (SEQ ID No 10) entsprechen.

Zur Gewinnung von Kontroll-Antikörpern, die spezifisch t β hCG (β 5, β 8, β 3) erkennen, wird entsprechend mit dem adäquaten, als Beispiel ausgewähltes synthetisches Peptid (SEQ ID No. 15) der Aminosäuresequenz des β hCG-Gens β 5 aus dem Epitop β 1 (SEQ ID No. 4) - Aminosäuresequenzbereich AS 1 bis 15 des t β hCG (SEQ ID No 8) verfahren:

K2: Ser - Lys - Glu - Pro - Leu - Arg - Pro - Arg - Cys - Arg - Pro (SEQ ID No. 15)

Die Immunisierung der Kaninchen war mit P2 und K2 genauso erfolgreich, wie mit P1 und K1. Es wurden mit P2 ebenfalls e β hCG-spezifische Antikörper erhalten, die keine Cross-Reaktivität für K2 oder t β hCG und auch keine Crossreaktivität zu β LH zeigten.

Ausführungsbeispiel 3:

Die Generierung von monoklonalen Antikörpern (mAb) erfolgt entsprechend der in der Literatur gut beschriebenen Hybridomherstellung für die ISOBM-mAb h54, 264, 277, 278, 287, 282 und 313 für Epitop β 8, FB-12 und 280 für Epitop β 9 und 265, 274 und 284 für Epitop β 1 mit Carrier-gebundenen synthetischen β hCG-Peptidsequenzen (18, 20-24, 45-48), wobei in den Peptidsequenzen die Aminosäuren an Position +2, +4 und +117 für das endometriale hCG (e β hCG) ausgetauscht wurden. Die Herstellung der ISOBM-mAb hatte

gezeigt, dass die Herstellung von Hybridomen, welche Antikörper der gewünschten β hCG-Spezifität sezernieren, zuverlässig wiederholbar ist (18, 24, 45-48).

Zur Hybridomherstellung wurden dabei die Carrier-gebundenen synthetischen e β hCG-spezifischen Peptidsequenzen P1 und P2 (SBQ ID No. 12 und 14) sowie die Kontrollpeptide K1 und K2 (SBQ ID No. 13 und 15) verwendet.

Die Herstellung der monoklonalen Antikörper für P1 wird nachfolgend näher erläutert:

Die Immunisierung erfolgte in BALB/c-Mäusen. Dazu werden pro Maus etwa 1 mg gereinigtes Carrier-gebundenes Peptid benötigt.

Immunisierung: 8 sechs bis acht Wochen alte weibliche BALB/c-Mäuse (Roche, Institut für Biologisch-Medizinische Forschung, Basel, Schweiz) werden mit dem entsprechend Ausführungsbeispiel 1 hergestellten KLH-gebundenen Peptid P1 für jedes Tier nach folgendem Protokoll immunisiert (18, 20, 24, 45-51): Die erste Immunisierung erfolgte durch subkutane Injektion von 50-150 μ g β hCG-Peptidimmunogens am Carrier pro Tier in kompletter Freund'scher Adjuvanz. Die weiteren Immunisierungen erfolgen jeden zweiten Tag durch Injektion derselben Menge Immunogen in inkompletter Freund'scher Adjuvanz. Am Tag 17 erhalten die Mäuse eine intraperitoneale Immunisierung mit wiederum je 50-150 μ g des Antigens in PBS für jedes Tier. Die Immunseren werden mit dem hCG-POD-System auf freigesetzte Antikörper getestet (ELISA in Ausführungsbeispiel 1). Die Mäuse mit den hohen hCG-Antikörper-Immunantworten (etwa 3) werden mit nochmals 50-150 μ g β hCG-Immunogen geboostert und nach drei Tagen für die Fusion vorgesehen.

Fusion: Nach der Immunisierung werden aus den Kniegelenk-Lymphknoten und Milzen derart immunisierter Mäuse die Splenozyten (B-Lymphozyten) isoliert und mit Zellen der Mausmyeloma-Zelllinie P3-X63-Ag8.653 (American Type Culture Collection) nach der Methode von Köhler und Milestein (51), wie bei Kovalevskaja (47) beschrieben, fusioniert. Das Verhältnis von Splenozyten zu Myelomazellen beträgt dabei 4:1 bis 6:1. RPMI-1640 mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) oder Polyethylenglycol 1500 (Sigma) wird als Fusionsmedium verwendet. Das Immunserum der ausgewählten Mäuse wird als Positivkontrolle gesammelt.

Selektion der fusionierten Zellen (Hybridomazellen): Die gebildeten Hybridomazellen werden nach der Fusion von den nicht fusionierten Myelomzellen abgetrennt, in Mikrotiterplatten verteilt und zusammen mit peritonealen Asciteszellen der Maus für eine Woche in einem RPMI-Kulturmedium, das Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT) mit 10% FKS enthält, kultiviert (46-50). Die Hälfte des Mediums wurde aller drei Tage ersetzt. An den Tagen 12-14 nach Fusion wird ein Anteil des Kulturüberstandes von den Wells auf die Anwesenheit von hCG-Antikörpern in einem ELISA geprüft (Screening der Oligoklone).

Das Screening der Oligoklone erfolgt in einem ELISA wie in Ausführungsbeispiel 1 beschrieben, mit dem Unterschied, dass Anstelle des biotinylierten Anti-Kaninchen-IgG- ein biotinylierter Anti-Maus-IgG-Antikörper (Dako) eingesetzt wurde.

Die Zellüberstände von 10 % der gescreenten Wells zeigten mit der ELISA-Platte, auf der P1 immobilisiert war – nicht jedoch mit der Negativ-Kontrollplatte – eine Farbreaktion im ELISA. 10 % der erhalten Oligo-Klone erkennen daher spezifisch das Peptid P1 – und nicht K1.

Drei besonders produktive Ig-positive Zellklone, P1.1, P1.2 und P1.3 zeigten einen besonders hohen Antikörpertiter mit der gewünschten ehCG-Spezifität und wurden für die weitere Subklonierung ausgewählt.

Subklonierung: Die selektierten Oligoklone werden jetzt zur Monoklonalität subkloniert (50). Dafür wurden positive Klone selektiert und *in vitro* weiter vermehrt (cloning by limiting dilution method). Die isolierten Kolonien wurden nochmals mit ELISA getestet. Die positiv getesteten Klone werden für den nächsten Zyklus der Klonierung eingesetzt. Drei Zyklen der Klonierung sind erforderlich, um spezifische, stabile Klone zu erhalten. Sie wurden für die Bildung von 100 ml Überstand mit dem monoklonalen Antikörper verwendet.

Die molekularen hCG-Antikörper wurden anschließend durch Affinitätschromatographie mit dem Protein A-Sepharose-Purification-System für monoklonale Antikörper (Biorad) gereinigt. Die Reinheit des mAb wurde durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese geprüft und anschließend die Proteinkonzentration bestimmt (18, 52).

Die Spezifität des Antikörpers wurde sowohl gegen das heterodimere $\alpha\beta$ hCG-Molekül mit e β hCG als β -Untereinheit, als auch gegen das angegebene Peptid P1 im oben beschriebenen ELISA nachgewiesen.

Die derart durch Immunisierung, Isolierung, Hybridisierung und Feinreinigung hergestellten monoklonalen Antikörper werden bei - 20° C gelagert.

Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern mit dem Peptid P2 erfolgte nach der gleichen Vorschrift und führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Es wurden mit P2 ebenfalls e β hCG-spezifische Antikörper erhalten, die keine Cross-Reaktivität für K2 oder t β hCG zeigten.

Ausführungsbeispiel 4:

Zum Nachweis des epithelialen endometrialen und dezidualen hCG (ehCG) in Körperflüssigkeiten und Gewebehomogenaten werden die nach Ausführungsbeispiel 1 bis 3 gewonnenen β hCG Epitop β 8- und β hCG Epitop β 1 -spezifischen endometrialen respektive dezidualen β hCG-Antikörper an Mikrotiterplatten adsorbiert und Testsysteme auf der Basis der ELISA-Technik entwickelt. Als Kontrollsystem dienen adäquate ELISA-Anordnungen unter Verwendung der vergleichbaren trophoblastären β hCG (thCG)-Antikörper des jeweiligen β hCG-Epitopes β 1 und β 8 (18, 21-24, 47).

Sandwich-ELISA: Entsprechend Ausführungsbeispiel 3 werden die immungereinigten P1 und P2 (e β hCG) sowie K1 und K2 (t β hCG) spezifischen monoklonalen e β hCG-Antikörper als Erstantikörper in einer Lösung von 100 μ l/well an MaxiSorp ELISA-Platten (Nunc, 96 wells) adsorbiert (10 μ g/ml in 200 mM Bicarbonat-Puffer, pH 9,6 , 1 Stunde bei 37° C oder über Nacht, 4° C). Die wells werden anschließend zweimal mit Waschpuffer (10 mM PBS, pH 7,2 mit 0,05% Tween 20) gewaschen und eine Stunde mit Blockingpuffer (1 % BSA in PBS pH 7,2) inkubiert.

Es folgt die Inkubation (jeweils 100 μ l, 1 Stunde , 37° C) mit dem Serum, in dem das endometriale hCG (e β hCG) nachgewiesen werden soll. Das Serum wird dazu 1:10 bis 1:1000 in Blocking-Puffer verdünnt. Als Standardreihe der hCG-Bestimmung werden zusätzlich die synthetischen Peptide P1, P2 (endometriumspezifisch) und K1 und K2 (trophoblast-

spezifisch) in sechs verschiedenen Konzentrationsstufen zwischen 0 und 1000 ng/ml inkubiert.

Wenn hCG in den verwendeten Proben anwesend ist, wird es sich an den immobilisierten endometrium- oder trophoblastspezifischen Antikörper der wells binden. Das Assaysystem benutzt nach jeweiligen Waschschritten den zweiten biotinylierten anti- β hCG-Antikörper, der sich als Sandwich an den immobilisierten solid phase- β hCG-Antikörper-/ β hCG-Komplex bindet. Als zweiter monoklonaler hCG/ β hCG-Antikörper der sowohl das endometriale als auch trophoblastäre Gesamt-molekül hCG und seine β -Untereinheit erkennt wird in diesem Ausführungsbeispiel ein biotinylierter Antikörper spezifisch für das hCG β 2 Epitop (INN-22 Serotec) verwendet. Nach Inkubation bei Zimmertemperatur und weiteren Waschschritten zur Entfernung des überschüssigen enzymgebundenen β hCG-Antikörpers wird fortgefahren wie im Ausführungsbeispiel 1 dargestellt. Die Detektion wird eingeleitet mit einer 1:2000 Verdünnung des Streptavidin-Peroxydase-Konjugates (Sigma) in PBS-T.

Nach 30 minütiger Inkubation bei 37° C wurde die Platte zweimal mit PBS-T und einmal mit PBS gewaschen und ein Substrat (100 μ l), das o-Phenylendiaminhydrochlorid enthielt, zugegeben. Die gelbbraune Farbentwicklung wurde nach 5 Minuten durch Zugabe von 50 μ l 2 M Schwefelsäure gestoppt und die optische Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 490 nm (referenzwellenlänge: 650 nm) bestimmt.

Ausführungsbeispiel 5:

Ein Testkit zum spezifischen Nachweis des endometrialen respektive dezidualen hCG und seiner β hCG-Untereinheit (e β hCG) in Körperflüssigkeiten und Gewebehomogenaten in einem ELISA enthält beispielsweise folgende Komponenten:

1. Eine mit e β hCG-spezifischen Antikörper Klon P1.2 aus Ausführungsbeispiel 3 (spezifisch für im Endometrium und Dezidua exprimierte e β hCG, erkennt nicht t β hCG) vorbeschichtete ELISA-Platte (jeweils 10 μ g pro well),
2. Sechs Verdünnungen des Peptids P1 als Standardreihe (0, 10, 50 100, 500, 1000 μ g/ml),
3. Waschpuffer PBS-T (10 mM PBS, pH 7,2 mit 0,05% Tween 20),
4. Blockingpuffer (1 % BSA in PBS pH 7,2),

5. biotinylierter GesamthCG/ β hCG-Antikörper als zweiter hCG-Antikörper spezifisch für das hCG β 2 Epitop (INN-22 Serotec),
6. Streptavidin-HRP-Konjugat (Dako),
7. PBS (Dako),
8. o-Phenylendiamin als Substrat,
9. 2 M Schwefelsäure als Stopplösung.

Alternativ zu Komponente 5 enthält der Testkit beispielsweise als zweiten hCG-Antikörper einen biotinylierten Antikörper spezifisch für das hCG β 4 Epitop (INN-24, Serotec).

Ein adäquater Testkit als Kontroll-Kit oder zur spezifischen Bestimmung des trophoblastären hCG in Körperflüssigkeiten oder Gewebekomogenaten enthält beispielsweise die obigen Komponenten 3. bis 9. und anstelle Komponente 1. einen durch die Immunisierung mit K1 erhaltenen β hCG-spezifischen Antikörper und anstelle Komponente 2. entsprechende Verdünnungen des Kontrollpeptides K1 als Standardreihe.

Mit dem Kit zum spezifischen Nachweis des eßhCG kann die Quantifizierung und Bewertung der spezifischen epithelialen endometrialen hCG-Sekretion (ehCG) in Körperflüssigkeiten und Zell- oder Gewebekomogenaten der frühen bis mittleren Sekretionsphase des menstruellen Zyklus optimale Implantationsbedingungen (Ausführungsbeispiel 6) wie auch mögliche Fertilisationsstörungen (Ausführungsbeispiel 7) sowohl prospektiv als auch retrograd unter dem Aspekt der endometrialen Diagnostik und Therapiekontrolle erfaßt werden.

Ausführungsbeispiel 6:

Für die prospektive Diagnostik der Embryorezeptivität in der frühen Sekretionsphase eines aktuellen Zyklus werden von der Patientin z. B. mit Kinderwunsch mittzyklisch ein Abstrich aus dem Zervikalkanal mit Zervikalsekret oder ein Scheidenabstrich mit Vaginalsekret für die diagnostische Bewertung der Implantationsbedingungen vorgenommen. Dieser Abstrich wird auf die vorhandene beginnende oder in Gang befindliche Exprimierung bzw. Sekretion des eßhCG mittels dem in Ausführungsbeispiel 4 beschriebenen ELISA untersucht. Damit können Aussagen über die Qualität der sekretorischen Transformation und der zu erwartenden und Rezeptivität des Endometriums getroffen werden.

Im Rahmen der in vitro-Fertilisation wird zwei Tage nach der Follikelpunktion kurzfristig ein Wattebausch in die Zervix eingelegt oder ein Scheidenabstrich abgenommen und mittels dem in Ausführungsbeispiel 4 beschriebenen ELISA die Aktivierung des eßhCG diagnostiziert. Ein positiver eßhCG-Nachweis signalisiert ein rezeptives Endometrium, und der noch in der Kultur befindliche Embryo kann 1 bis 2 Tage später transferiert werden. Fällt hingegen der Test negativ aus, wird der Embryo kryokonserviert und im nächsten für eßhCG positiv befundenen Zyklus in die Gebärmutterhöhle eingespült. Es können damit Entscheidungen zum Embryotransfer oder zur Insemination der hormonell stimulierten Patientin für den aktuellen oder erst nächstfolgenden Zyklus getroffen werden. Neben dem Cervixsekret kann aber auch Probenmaterial (Gewebe, Zellen, Perfusat) anderer epithelialer Organe wie Mundschleimhaut oder Vaginalschleimhaut eingesetzt werden. Da alle epithelialen Organe dem Zyklus mehr oder wenig unterworfen sind, können auch diese in die Untersuchung einbezogen werden.

Ausführungsbeispiel 7:

Mit diesem Ausführungsbeispiel können bei Patientinnen physiologische oder pathologische Endometriumzustände detektiert und mögliche Fertilisationsstörungen unter dem Aspekt der endometrialen hCG-Diagnostik und Therapiekontrolle im aktuellen Zyklus oder Folgezyklus erfaßt und bewertet werden.

Zu diesem Zweck werden der Patientin in der sekretorischen Phase der endometrialen Transformation, vor allem der mittleren Sekretionsphase um den 20.-24. Zyklustag, ein Abstrich aus dem Zervikalkanal mit Cervikalsekret oder Scheidenabstrich mit Vaginalsekret für die diagnostische Bewertung vorgenommen.

Dieser Abstrich wird auf die vorhandene beginnende oder in Gang befindliche Exprimierung bzw. Sekretion des eßhCG mittels dem in Ausführungsbeispiel 4 beschriebenen ELISA untersucht. Damit können Aussagen zur fehlenden, unterwertigen oder hohen sekretorischen Transformation des Endometrium und der Qualität der zu erwartenden Rezeptivität des Endometrium für die Patientin getroffen werden.

Das Vorhandensein von eindeutig meßbarem eßhCG am 20. bis 24. Zyklustag signalisiert ein gesundes zeit- und funktionsgerecht umgewandeltes Endometrium. Dies ist gleichzeitig Ausdruck einer ungestörten Interaktion zwischen Hypothalamus und Hypophyse, dem Eierstock und dem Uterus. Mit dem angegebenen Verfahren des Abstriches von Patientinnen

für Untersuchungen des ehCG in Körperflüssigkeiten und Zell- und Gewebekomponenten kann die Diagnostik und Therapiekontrolle der Uterusfunktion vorgenommen werden. Für diese ehCG-Bestimmungen mit den obengenannten Methoden kann auch das kürettierte Endometrium von Strichabrasionen nach diagnostischer Indikation eingesetzt werden.

Ausführungsbeispiel 8:

Auch die Abnahme von Menstrualblut bei Patientinnen nach unstimulierten, stimulierten oder gestörten Zyklus stellt eine wichtige, einfache und bisher nicht genutzte Methode der retrograden Implantationsdiagnostik dar, um Aussagen über die sekretorische Transformation des Endometriums des vorangegangenen Zyklus zu detektieren und um gegebenenfalls Aussagen für die Rezeptivität des Folgezyklus zu treffen. Diese nicht invasive Methode kann die invasive Methode der diagnostischen Strichabrasio in ihrer Aussage ergänzen oder ersetzen.

Das Menstrualblut im Ergebnis der endometrialen Desquamation wird wie Peripherblut nach Zentrifugation zur Abtrennung von Zellmaterial und Stroma für die direkten Messungen der endometrialen hCG-Sekretion (ehCG) mit spezifischen ehCG-Antikörpern im ELISA-Test entsprechend Ausführungsbeispiel 4 eingesetzt. Das Menstrualblut wird nach spontanem Zyklus, nach Hormontherapie, nach IVF und ET ohne erfolgreiche Implantation sowie bei vorgesehener Diagnostik des Zyklus bei Kinderwunschpatientinnen und bei IUD-Patientinnen, Myom und Endometriose gewonnen. Dabei erfolgte eine parallele Analyse von Peripherblut zum selben Zeitpunkt zum Ausschluß eines ebenfalls erhöhten Serumwertes von ehCG.

Das vom Menstrualblut abgetrennte epitheliale und stromale Zellmaterial des endometrialen Gewebes nach Desquamation wird ebenso wie das Menstrualplasma mittel ELISA-Tests zur Bewertung der Expression und Sekretion des endometrialen hCG im vorangegangenen Zyklus genutzt.

Ausführungsbeispiel 9:

Die Diagnostik für eine Differenzierung zwischen mütterlich-dezidualen vs. embryonal-trophoblastären Störungen bei Abortneigung und beginnendem Abort basiert darauf, dass im mütterlich-deziduale Gewebe der Schwangerschaft wie im sekretorischen Endometrium eßhCG exprimiert wird. Im embryonal-trophoblastären Gewebe der Plazenta wird trophoblastäres hCG exprimiert und translatiert. Die hCG-Konzentrationen des Peripherblutes in der Schwangerschaft zeigen ein Sekretionsmaximum im ersten Trimenon und sind über das zweite und dritte Trimenon beträchtlich.

Mit diesem Ausführungsbeispiel wird eine Anwendung aufgezeigt, im Peripherblut, aber auch im Vaginal- oder Zervixsekret nach Abstrich, im freigesetzten Fruchtwasser bei perforierter oder geplatzter Blase, im Lochialblut sowie anderen epithelialen Sekreten und/oder deren Zell- und Gewebekomponenten von Patientinnen in der Schwangerschaft hCG differenziert als endometrial/deziduales hCG (ehCG) und trophoblastäres hCG (thCG) im ELISA-Test oder in der quantitativen Real time RT-PCR zu bestimmen.

Bei drohendem Abort, gekennzeichnet durch eine beginnende uterine Blutung, wird therapeutisch polypragmatisch vorgegangen, weil zumeist die Ursache der Störung unklar ist. Bei drohendem Abort kann aber durch eine Differenzierung von embryonalen hCG (ehCG) und dem trophoblastären hCG (thCG) zwischen einer mütterlich-dezidualen vs. trophoblastär-embryonalen Ursache der Störung unterschieden werden.

Dazu wird Serum von der Patientin oder die oben angegebenen weiteren Körperflüssigkeiten und Zell- und Gewebekomponenten entnommen und mit den beiden in der Erfindung entwickelten ELISA-Kits auf ehCG und/oder thCG untersucht (Ausführungsbeispiel 4). thCG kann auch mit herkömmlichen kommerziellen Kits erfasst werden, die für übliche plazentare hCG-Messungen in der Schwangerschaft empfohlen werden. (DPI, Abbott, Serono, Roche, Baxter). Ein niedriges ehCG zeigt eine beginnende deziduale Insuffizienz, während ein im Verhältnis niedriges thCG eine Störung der fetoplazentaren Einheit signalisiert. Während die erste Störung behandelbar ist, muss bei der Störung der thCG-Sekretion überprüft werden, ob eine Therapie machbar und sinnvoll ist.

Auch lässt sich die Prognose einer drohenden Fehlgeburt aus dem Blut detektieren. Dazu wird Abortblut mit einem Spekulum aus dem hinteren Scheidengewölbe entnommen und eine Bestimmung des ehCG mit dem in der Erfindung entwickelten ELISA-Kit vorgenommen. Bei geringen Blutungen kann mit einem Wattebausch Blut oder blutiger Cervixschleim entnommen und mittels ELISA-Test (Ausführungsbeispiel 4) und/oder quantitativer Real time RT-PCR auf ehCG untersucht werden. Ein hoher ehCG-Nachweis weist auf eine deziduale Störung hin. Bei sehr hohen ehCG-Werten muss mit einer nicht therapierbaren Fehlgeburt gerechnet werden.

Das Verfahren dieses Ausführungsbeispiels kann auch zur Therapiekontrolle in der Behandlung dezidualer Störungen genutzt werden.

Ausführungsbeispiel 10:

Das Frühgeburtsscreening bzw. die Diagnostik des Geburtsbeginnes basiert darauf, dass das embryonale hCG (ehCG) im Genitaltrakt vor der Frühgeburt erhöht ist, während das ehCG im Serum erniedrigt gefunden wird. Aus diesem Grund läßt sich das obengenannte Verfahren zum Frühgeburtsscreening einsetzen. Ein gleichsinniges Muster wird auch bei Geburtsbeginn am Ende der Schwangerschaft gefunden.

Bei Patientinnen werden für ein Frühgeburtsscreening oder zur Diagnose des Geburtsbeginns aus dem Genitaltrakt (Cervix, hinteres Scheidengewölbe) Sekret oder Zellen entnommen. Im Sekret wird mit obengenannten ELISA-Test das ehCG bestimmt, während bei der Gewinnung von Zellen im Sekret mittels der quantitative Real time RT-PCR die ehCG β 7-Expression erfaßt wird. Ein erhöhter ehCG-Nachweis im Sekret signalisiert eine beginnende Frühgeburt, ebenso wie ein vermindertes ehCG β 7 in den Zellen des Genitaltraktes.

Außerdem ist ein Frühgeburtenscreening durch eine Serumuntersuchung möglich. Dabei wird Serum von der Patientin gewonnen und das ehCG bestimmt. Bei niedrigen bzw. abfallenden ehCG-Werten ist mit einer Frühgeburt zu rechnen.

Anstelle des in den Ausführungsbeispielen beschriebenen ELISA-Tests zum Nachweis der ehCG Konzentration kann in den Gewebeproben auch eine quantitative Erfassung der ehCG-Genexpression durch Real time RT-PCR erfolgen.

Abkürzungsverzeichnis:

In der Erfindungsbeschreibung werden folgende Abkürzungen verwendet:

α hCG	alpha-Untereinheit des humanen Choriongonadotropin
β hCG	beta-Untereinheit des humanen Choriongonadotropin
BSA	Bovines Serumalbumin
CTP	C-terminales Peptid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ET	Embryotransfer
e β hCG	endometriale beta-Untereinheit des humanen Choriongonadotropin
ehCG	endometriales humanes Choriongonadotropin (e β hCG + α hCG)
hCG	Humanes Choriongonadotropin
IgG	Immunglobulin Gamma
ISOBM	International Society of Oncodevelopmental Biology and Medicine
IUD	Intrauterine Device
IVF	In-vitro-Fertilisation
KLH	keyhole limpet hemocyanin hemocyanin
PBS-T	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit Zusatz von 0,1 % Tween 20
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay
mAb	Monoklonaler Antikörper (monoclonal antibody)
MBIA	Micropartikel-Enzym-Immuno-Assay
mM	mMol/Liter
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
t β hCG	trophoblastäre beta-Untereinheit des humanen Choriongonadotropin

Zitierte Nicht-Patentliteratur:

- (1) J.C.Pierce, T.F.Parsons, *Annu.Rev.Biochem.*, **50** (1981) 465-495
- (2) P.A.Rothman, V.A.Chao, M.R. Taylor et al., *Mol.Reprod.Dev.*, **33** (1992) 1-6
- (3) S.Dirnhofer, M.Hermann, et al., *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, **81** (1996) 4212-4217
- (4) Z.M.Lei, P.Toth, C.V.Rao und D.Pridham, *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, **77** (1993) 863-972
- (5) T.Yokotani, T.Koizumi, R.Taniguchi et al., *Int.J.Cancer*, **71** (1997) 539-544
- (6) P.Berger, W.Kranewitter, S.Madersbacher et al., *FEBS Lett.*, **343** (1994) 229-233
- (7) D.Bellet, V.Lazar, I.Bieche et al., *Cancer Res.*, **57** (1997) 516-523
- (8) I.Marcilliac, F.Troalen, J.-M.Bidart et al., *Cancer Res.*, **52** (1992) 3901-3907
- (9) H.Alfthan, C.Haglund, J.Dabek et al., *Clin.Chem.*, **38** (1992) 1981-1987
- (10) V.Lazar, S.G.Diez, A.Laurent et al., *Cancer Res.*, **55** (1995) 3735-3738
- (11) P.N.Span, C.M.G.Thomas, J.J.Heuvel et al., *J.Endocrinol.*, **172** (2002) 489-495
- (12) M.Lundin, S.Nordling, J.Lundin et al., *Int.J.Cancer*, **95** (2001) 18-22
- (13) K.Hotakainen, B.Ljungberg, A.Paju et al., *Brit.J.Cancer*, **86** (2001) 185-189
- (14) D.S.Hoon, T.Sarantou, F.Doiet al., *Int.J.Cancer*, **69** (1996) 369-374
- (15) M.Bo und I.J.Boime, *J.Biol.Chem.*, **267** (1992) 3179-3184
- (16) K.Talmadge, N.C.Vamvakopoulos und J.C.Fiddes, *Nature*, **307** (1984) 37-40
- (17) P.Policastro, C.Ovitt, M.Hoshina et al., *J.Biol.Chem.*, **258** (1983) 11492-11499
- (18) P.Berger, C.Sturgeon, J.M.Bidart et al., *Tumor Biol.*, **23** (2001) 1-38
- (19) J.M.Bidart, S.Birken, P.Berger et al., *Scand.J.Clin.Lab.Invest.*, **216** (1993) 118-136
- (20) P.Berger, J.M.Bidart, P.S.Delves et al., *Mol.Cell Endocrinol.*, **125** (1996) 33-43
- (21) S.Dirnhofer, S.Madersbacher, J.M.Bidart et al., *J.Endocrinol.*, **141** (1994) 153-162
- (22) P.Berger, R.Klieber, W.Panmuong et al., *J.Endocrinol.*, **125** (1990) 301-309
- (23) J.M.Bidart, F.Troalen, C.J.Bohuon et al., *J.Biol.Chem.*, **262** (1987) 15483-15489
- (24) J.M.Bidart, D.H.Bellet, G.F.Alberici et al., *Mol.Immunol.*, **24** (1987) 339-345
- (25) P.K.Hotakainen, E.M.Serlachius et al., *Mol.Cell.Endocrinol.*, **162** (2000) 79-85
- (26) A.K.Müller-Lindholm, C.J.Labenz, J.Ramey et al., *Endocrinology*, **138** (1997) 5459-5465
- (27) S.Madersbacher, C.Kratzik, R.Gerth et al., *Cancer Res.*, **54** (1994) 5096-5100
- (28) R.Oyasu, L.Nan, P.Smith et al., *Arch.Pathol.Lab.Med.*, **119** (1994) 715-717
- (29) L.A.Cole, *Clin.Chem.*, **43** (1997) 2233-2243
- (30) L.A.Cole, *J. Reprod. Med.*, **43** (1998) 3-10
- (31) L.A.Cole, K.M.Rinne, S.Shahabi et al., *Clin. Chem.*, **45** (1999) 313-314
- (32) A.Kardana, M.M.Elliott, M.A.Gawinowicz et al., *Endocrinology*, **129** (1991) 1541-1550

- (33) S.Birken, A.Krichevsky, J.O'Connor et al., *Endocrine*, **10** (1999) 137-144
- (34) A.Krichevsky, S.Birken, J.O'Connor et al., *Endocrinology*, **134** (1994) 1139-1145
- (35) G.Kovalevskaya, S.Birken, T.Kakuma et al., *J. Endocrinol.*, **161** (2000) 99-109
- (36) P.Mock, G.Kovalevskaya, J.F.O'Connor et al., *Hum. Reprod.*, **15** (2000) 2209-2214
- (37) P.Mock, P.Bischof, R.Rivest et al., *Hum. Reprod.*, **13** (1998) 2629-2632
- (38) M.Seppälä, B.-M.Rutanen, et al., *J.Clin.Endocrinol. Metab.*, **47** (1978) 1216-1219
- (39) R.W.Sharpe, W.Wrixon, et al., *J.Clin.Endocrinol. Metab.*, **45** (1977) 496-499
- (45) G.Kovalevskaya, S.Birken, T.Kakuma et al., *Clin. Chem.*, **45** (1999) 68-77
- (46) C.Stähli, T.Staehelin, V.Miggiano et al., *J.Immunol.Method.*, **32** (1980) 297-304
- (47) G.Kovalevskaya, S.Birke, J.O'Connor et al., *Endocrine*, **3** (1995) 881-887
- (48) J.B.Conde, A.B.Moreno, C.A.Bas, *Hybridoma and Hybridomics* **21** (2002) 381-384
- (49) R.B.Marrifield, *J.Am.Chem.Soc.*, **85** (1963) 2149-2154
- (50) A.M.Krieg, *Am.Rev.Immunol.*, **20** (2002) 709-760
- (51) G.Köhler, C.Milestein, *Nature*, **256** (1975) 495
- (52) S.Madersbach, P.Berger, *Methods*, **21** (2000) 41-50
- (53) Pierce, Rockford, USA: EZ Antibody Production and Purification Kit, Carboxy Reactive
- (54) L.A.Cole, *Gynecol.Oncol.*, **71** (1998) 325-329

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Bestimmung von definierten Zuständen oder Veränderungen in der Uterusschleimhaut oder im Epithel anderer Organe, bei dem in einer Körperflüssigkeitsprobe und/oder Gewebeprobe und/oder Zellen die Konzentration von humanen endometrialem Choriongonadotropin (eßhCG/ehCG) und/oder nicht-trophoblastärem hCG (hCG TypI, $\beta 6$, $\beta 7$) spezifisch bestimmt wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass auch die Konzentration von trophoblastärem hCG (hCG Typ II, tßhCG) oder Gesamt-ßhCG oder Gesamt-hCG bestimmt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der Konzentration von endometrialem hCG (eßhCG/ehCG) mit mindestens einem Antikörper erfolgt, der spezifisch endometriales hCG (eßhCG/ehCG) und nicht trophoblastäres hCG (hCG Typ II, tßhCG) erkennt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Antikörper spezifisch ein Peptid ausgewählt aus den Peptidsequenzen gemäß SEQ ID No. 1 oder 3 oder deren Teilsequenzen erkennt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4 dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der Konzentration von endometrialem hCG und gegebenenfalls trophoblastärem hCG oder Gesamt-ßhCG oder Gesamt-hCG in einer Probe in Form von Sekreten, Perfusionsflüssigkeit, Zellen oder Gewebe erfolgt, wobei diese aus peripherem Blut, Serum, Lochia, Menstrualblut, Fruchtwasser, Urin, Speichel, Augenkammerwasser, dem Urogenital- (insbesondere Uterus, Zervix, Vaginalproben), dem Gastrointestinal- (insbesondere Mundschleimhaut), dem Respirationstrakt oder dem zentralen Nervensystems (insbesondere Liquor) stammen.
6. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Bestimmung der Aufnahmebereitschaft der Uterusschleimhaut für eine befruchtete Eizelle in einer prospektiven oder retrospektiven Embryo-Implantationsdiagnostik.

7. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 2 bis 5 zur Diagnose einer Schwangerschaft, eines frühen Schwangerschaftsverlustes, einer Extrauterin gravidität, des Schwangerschaftsverlaufs, von Schwangerschaftsstörungen, insbesondere zur Differenzierung zwischen Störung des Endometriums/Dezidua von einer trophoblastären/embryonalen Störung, zur Diagnose eines drohenden oder in Gang befindlichen Aborts, des Geburtsbeginns, für das Frühgeburten-Screening, zur Diagnose der Lochia oder Dezidua nach gestörter Schwangerschaft oder zur Beurteilung der Effektivität einer kontrazeptiven Methode.
8. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 2 bis 5 zur Diagnose eines physiologischen Aufbaus eines Epithels oder einer beginnenden Dedifferenzierung oder einer beginnenden karzinomatösen Entartung oder eines Karzinoms und/oder zur Diagnose des „Phantom-hCGs“.
9. Verwendung eines Verfahrens bei dem die Konzentration an Gesamt-hCG- oder seiner β -Untereinheiten bestimmt wird zur Diagnose der Aufnahmebereitschaft der Uterusschleimhaut für eine befruchtete Eizelle in einer prospektiven oder retrospektiven Embryo-Implantationsdiagnostik.
10. Verfahren zur Bestimmung von definierten Zuständen oder Veränderungen in der Uterusschleimhaut oder im Epithel anderer Organe, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der Konzentration an Gesamt-hCG- oder seiner β -Untereinheiten in einer Probe aus Menstrualblut erfolgt.
11. Verwendung eines Verfahrens nach Anspruch 10 zur Bestimmung der Aufnahmebereitschaft der Uterusschleimhaut für eine befruchtete Eizelle in einer retrospektiven Embryo-Implantationsdiagnostik.
12. Antikörper, der spezifisch endometriales hCG (e β hCG/ehCG) und nicht trophoblastäres hCG (hCG Typ II, t β hCG) erkennt.
13. Antikörper nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass er spezifisch ein Peptid ausgewählt aus den Peptidsequenzen gemäß SBQ ID No. 1 oder 3 oder deren Teilsequenzen erkennt.

14. Antikörper, der spezifisch die trophoblästäres humanes Choriongonadotropin (hCG Typ II/tßhCG) erkennt und nicht endometriales humanes Choriongonadotropin (eßhCG/ehCG).
15. Antikörper nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass er spezifisch ein Peptid ausgewählt aus den Peptidsequenzen gemäß SEQ ID No. 2 oder 4 oder deren Teilsequenzen erkennt.
16. Testkit zur Bestimmung von definierten Zuständen oder Veränderungen in der Uterusschleimhaut oder im Epithel anderer Organe enthaltend mindestens einen Antikörper gemäß einem der Ansprüche 12 bis 15, sowie weitere Antikörper und Standards.
17. Endometriale β -Untereinheit von humanem Choriongonadotropin (eßhCG) mit einer Aminosäuresequenz gemäß SEQ ID No 10.
18. Gensequenz β 6e codierend für die endometrialen β -Untereinheit von humanem Choriongonadotropin (eßhCG) gemäß SEQ ID No 7.
19. Peptid ausgewählt aus den Aminosäuresequenzen gemäß SEQ ID No. 1, 3, 12 und 14.
20. Verwendung eines Antikörpers gemäß einem der Ansprüche 12 bis 15 oder eines Testkits nach Anspruch 16 oder von Peptiden gemäß Anspruch 19 zur Bestimmung von definierten Zuständen oder Veränderungen in der Uterusschleimhaut oder im Epithel anderer Organe, insbesondere zur Schwangerschaftsdiagnose oder zur Diagnose der Aufnahmebereitschaft der Uterusschleimhaut für eine befruchtete Eizelle in einer prospektiven oder retrospektiven Embryo-Implantatsdiagnostik, zur Diagnose einer Schwangerschaft, eines frühen Schwangerschaftsverlustes, einer Extrauterin gravidität, des Schwangerschaftsverlaufs, von Schwangerschaftsstörungen, insbesondere zur Differenzierung zwischen Störung des Endometriums/Dezidua von einer trophoblästären/embryonalen Störung, zur Diagnose eines drohenden oder in Gang befindlichen Aborts, des Geburtsbeginns, für das Frühgeburten-Screening, zur Diagnose der Lochia oder Dezidua nach gestörter Schwangerschaft oder zur Beurteilung der Effektivität einer kontrazeptiven Methode, zur Diagnose eines physiologischen Aufbaus eines Epithels oder

einer beginnenden Dedifferenzierung oder einer beginnenden karzinomatösen Entartung oder eines Karzinoms und/oder zur Diagnose des Phantom-hCGs.

21. Verwendung der Endometrialen β -Untereinheit von humanem Choriongonadotropin (e β hCG) mit einer Aminosäuresequenz nach Anspruch 17 oder der Gensequenz nach Anspruch 18 als Marker für den gesunden Aufbau und Funktion des Endometriums oder der Dezidua, insbesondere in der Schwangerschaftsdiagnose oder der Diagnose der Aufnahmbereitschaft der Uterusschleimhaut für eine befruchtete Eizelle, in einer prospektiven oder retrospektiven Embryo-Implantatsdiagnostik, zur Diagnose einer Schwangerschaft, eines frühen Schwangerschaftsverlustes, einer Extrauterin gravidität, des Schwangerschaftsverlaufs, von Schwangerschaftsstörungen, insbesondere zur Differenzierung zwischen Störung des Endometriums/Dezidua von einer trophoblastären/embryonalen Störung, zur Diagnose eines drohenden oder in Gang befindlichen Aborts, des Geburtsbeginns, für das Frühgeburten-Screening, zur Diagnose der Lochia oder Dezidua nach gestörter Schwangerschaft oder zur Beurteilung der Effektivität einer kontrazeptiven Methode, zur Diagnose eines physiologischen Aufbaus eines Epithels oder einer beginnenden Dedifferenzierung oder einer beginnenden karzinomatösen Entartung oder eines Karzinoms und/oder zur Diagnose des Phantom-hCGs.

** Transkriptionsstart ShCG

DEC 03 2005

LH4
CG5 tta aat CCA GCA CTT TGC TCG GGT CAC GGC CTC CTC CTG GCT
CG6g.C.T.T.
CG7g.T.T.T.
Endo C CTG GTT
-360 -330

LH4 A A T C T
CG5 CCC AGG ACC CCA CCA TAG GCA GAG GCA GGC CTT CCT ACA CCC TAC TCC CTG TGC CTC CAG
CG6A.T.T.T.T.
CG7A.T.T.T.T.
Endo CCC AAG ACC CCA CCA TAG GCA GAG GCA GGC CTT CCT ACA CCC TAC TCT CTG TGC CTC CAG
-300 -270

LH4 C G A T
CG5 GCT CGA CTA GTC CCT AGC ACT CGA CGA CTG AGT CTC TGA GAT CAC TTC ACC GTG GTC TCC
CG6 C... ..A.G.G.G.
CG7 C... ..G.A.A.A.
Endo CCT CGA CTA GTC CCT ARC ACT CGA CGA CTG AGT CTC AGA GGT CAC TTC ACC GTG GTC TCC
-240 -210

LH4 C T C A CG G CA
CG5 GCC TCA CCC TTG GCG CTG GAC CAG TGA GAG GAG AGG GCT GGG GCG CTC CGC TGA GCC ACT
CG6T.C. ..A.C.G.A.T.T.
CG7T.T.A.C.G.A.T.T.
Endo GCC TCA TCC TTG GYG CTA GAC CAC TGA GGG GAG AGG ACT GGG GTG CTC CGC TGA GCC ACT
-180 -150

LH4 C T A G C C G A C G T
CG5 CCT GCG CCC CCC TGG CCT TGT CTA CCT CTT GCC CCC CGA AGG GTT AGT GTC GAG CTC ACC
CG6T. ..T.T.T.C.G.G.G.
CG7T. ..T.T.T.C.G.C.C.
Endo CCT GTG CCT CCC TGG CCT TGT CTA CTT CTC GCC CCC CGA AGG GTT AGT GTC SAG CTC ACT
-120 -90

LH4 G TC C A
CG5 CCA G-C ATC CTA CAA CCT CCT GGT GGC CTT GCC GCC CCC ACA ACC CCG AGG TAT AAA GCC
CG6-C.C.G. ...
CG7-A.A.A. ...
Endo CCA G-C ATC CTA CAA CCT CCT GGT GGC CTT GMC GCC CCC ACA AMC CCG AGG TAT RAA GCC
-60 -30

LH leu
hCG met glu met phe gln gly leu leu leu leu
LH4 A G T C
CG5 AGG TAC ACG AGG CAG GGG ACG CAC CAA GG ATG GAG ATG TTC CAG GGG CTG CTG CTG TTG
CG6C.C.C.C.C.C.C.
CG7C.C.C.C.C.C.C.
Endo AGG TAC ACC AGG CAG GGG ACG CAC CAA GG ATG GAG ATG TTC CAG GGG CTG CTG CTG TTG
-1 +1 +30

LH ala arg pro trp his
hCG leu leu leu ser met gly gly thr trp ala ser lys glu pro leu arg pro arg cys arg
LH4 G G G T
CG5 CTG CTG CTG AGC ATG GGC GGG ACA TGG GCA TCC AAG GAG CCG CTT CGG CCA CGG TGC CGC
CG6C.C.C.C.C.C.C.
CG7C.C.C.C.C.C.C.
Endo CTG CTG CTG AGC ATG GGC GGG ACA TGG GCA TCC AGG GAG ATG CTT CGG CCA CGG TGC CGC
+60 lys/arg met +90

LH ile
hCG pro ile asn ala thr leu ala val glu lys glu gly cys pro val cys ile thr val asn
LH4 T
CG5 CCC ATC AAT GCC ACC CTG GCT GTG GAG AAG GAG GGC TGC CCC GTG TGC ATC ACC GTC AAC
CG6C.C.C.C.C.C.C.
CG7C.C.C.C.C.C.C.
Endo CCC ATC AAT GCC ACC CTG GCT GTG GAG AAG GAG GGC TGC CCC GTG TGC ATC ACC GTC AAC
+120 +150

Fig. 1

Sequenzprotokoll - Sequence Listing

<110> Universität Leipzig

<120> Verfahren und Mittel zur Bestimmung von bestimmten Zuständen bzw. Veränderungen im Uterusepithel und in Epithelien anderer Organe

<130> 401P07PCT

<150> DE10325639.3

<151> 2003-06-06

<150> DE10325638.5

<151> 2003-06-06

<160> 15

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Epitope eß9 (eßhCG)

<400> 1

Thr	Cys	Asp	Asp	Pro	Arg	Phe	Gln	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Lys	Ala
1				5					10					15

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Epitope ß9 (tßhCG)

<400> 2

Thr	Cys	Asp	Asp	Pro	Arg	Phe	Gln	Asp	Ser	Ser	Ser	Ser	Lys	Ala
1				5					10					15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Epitope eß1 (eßhCG)

<400> 3

Ser	Arg	Glu	Met	Leu	Arg	Pro	Arg	Cys	Arg	Pro	Ile	Asn	Ala	Thr
1				5					10					15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Epitope ß1 (tßhCG)

<400> 4

Ser	Lys	Glu	Pro	Leu	Arg	Pro	Arg	Cys	Arg	Pro	Ile	Asn	Ala	Thr
1				5					10					15

<210> 5
 <211> 861
 <212> DNA
 <213> human
 <220>
 <223> β hCG β 7 cDNA-Sequenz
 <400> 5

```

agcactttcc tcgggtcacg gcctcctcct ggttcccaag accccaccat aggcagaggc 60
aggccttcct acaccctact ctctgtgcct ccagcctcga ctagtcccta gcactcgacg 120
actgagtctc agaggtcact tcaccgtggg ctccgcctca tccttggcgc tagaccactg 180
aggggagagg actgggggtgc tccgctgagc cactcctgtg cctccctggc cttgtctact 240
tctcgccccc cgaagggtta gtgtccagct cactccagca tcctacaacc tcctgggtggc 300
cttgacgccc ccacaaaccc gaggtataaa gccagggtaca ccaggcaggg gacgcaccaa 360
ggatggagat gttccagggg ctgctgctgt tgctgctgct gagcatgggc gggacatggg 420
catccaagga gatgcttcgg ccacgggtgcc gcccacatcaa tgccaccctg gctgtggaga 480
aggagggctg ccccggtgtgc atcaccgtca acaccaccat ctgtgccggc tactgcccc 540
ccatgacccg cgtgctgcag ggggtcctgc cggccctgcc tcagggtggg tgcaactacc 600
gcgatgtgcg cttcgagtcc atccggctcc ctggctgccc gcgcggcgtg aaccccggtg 660
tctcctacgc cgtggctctc agctgtcaat gtgcaactct cgcgcgcagc accactgact 720
gcgggggtcc caaggaccac cccttgacct gtgatgacct ccgcttcag gcctcctctt 780
cctcaaaggc ccctccccc agccttccaa gtccatcccg actcccgggg ccctcggaca 840
ccccgatcct ccacaataa a 861
  
```

<210> 6
 <211> 861
 <212> DNA
 <213> human
 <220>
 <223> β hCG β 6 cDNA-Sequenz
 <400> 6

```

agcactttcc tcgggtcacg gcctcctcct ggttcccaag accccaccat aggcagaggc 60
aggccttcct acaccctact ctctgtgcct ccagcctcga ctagtcccta acactcgacg 120
actgagtctc agaggtcact tcaccgtggg ctccgcctca tccttggcgc tagaccactg 180
aggggagagg actgggggtgc tccgctgagc cactcctgtg cctccctggc cttgtctact 240
tctcgccccc cgaagggtta gtgtcgagct cactccagca tcctacaacc tcctgggtggc 300
cttgccgccc ccacaacccc gaggtatgaa gccagggtaca ccaggcaggg gacgcaccaa 360
ggatggagat gttccagggg ctgctgctgt tgctgctgct gagcatgggc gggacatggg 420
catccaagga gccacttcgg ccacgggtgcc gcccacatcaa tgccaccctg gctgtggaga 480
aggagggctg ccccggtgtgc atcaccgtca acaccaccat ctgtgccggc tactgcccc 540
ccatgacccg cgtgctgcag ggggtcctgc cggccctgcc tcagggtggg tgcaactacc 600
gcgatgtgcg cttcgagtcc atccggctcc ctggctgccc gcgcggcgtg aaccccggtg 660
tctcctacgc cgtggctctc agctgtcaat gtgcaactct cgcgcgcagc accactgact 720
gcgggggtcc caaggaccac cccttgacct gtgatgacct ccgcttcag gcctcctctt 780
cctcaaaggc ccctccccc agccttccaa gtccatcccg actcccgggg ccctcggaca 840
ccccgatcct ccacaataa a 861
  
```

<210> 7
 <211> 861
 <212> DNA
 <213> human
 <220>
 <223> eβhCG ("endo" β6e) cDNA-Sequenz
 <400> 7

```

agcacttttc tccgggtcacg gcctcctcct ggttcccaag accccaccat aggcagagggc 60
aggccttcct acaccctact ctctgtgcct ccagcctcga ctagtcccta ractcgcacg 120
actgagtctc agagggtcact tcaccgtggg ctccgcctca tccttggygc tagaacactg 180
aggggagagg actgggggtgc tccgctgagc cactcctgtg cctccctggc cttgtctact 240
tctgcccccc cgaagggtta gtgtcsagct cactccagca tcctacaacc tcctgggtggc 300
cttgmcgccc ccacaamccc gaggtatraa gccaggtaca ccaggcaggg gacgcaccaa 360
ggatggagat gttccagggg ctgctgctgt tgctgctgct gagcatgggc gggacatggg 420
catccargga gmyrcttcgg ccacgggtgcc gcccaccaa tgccaccctg gctgtggaga 480
aggagggctg ccccggtgtgc atcacgtca acaccaccat ctgtgccggc tactgccccca 540
ccatgaccgc cgtgctgcag ggggtcctgc cggccctgcc tcagggtggg tgcaactacc 600
gcgatgtgcg cttcgagtcc atccggtcc ctggctgccc gcgcggcgtg aaccccggtg 660
tctcctacgc cgtggctctc agctgtcaat gtgactctg ccgccgcagc accactgact 720
gcgggggtcc caaggaccac cccttgacct gtgatgacct ccgcttcag gcctcctctt 780
cctcaaaggc ccctcccccc agccttccaa gtccatcccg actcccgggg ccctcggaca 840
ccccgatcct ccacaataa a 861
  
```

m: c,a r: g,a s: g, y: t,c

<210> 8
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> human
 <220>
 <223> t β hCG β 5, β 8, β 3 (prehormone)
 <400> 8

Met	Glu	Met	Phe	Gln	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Met	Gly	-20	-15	-10	-5
Gly	Thr	Trp	Ala	Ser	Lys	Glu	Pro	Leu	Arg	Pro	Arg	Cys	Arg	Pro	Ile	-1	1	5	10
Asn	Ala	Thr	Leu	Ala	Val	Glu	Lys	Glu	Gly	Cys	Pro	Val	Cys	Ile	Thr	15	20	25	
Val	Asn	Thr	Thr	Ile	Cys	Ala	Gly	Tyr	Cys	Pro	Thr	Met	Met	Arg	Val	30	35	40	
Gly	Val	Leu	Gln	Leu	Pro	Ala	Leu	Pro	Gln	Val	Val	Cys	Asn	Tyr	Arg	45	50	55	60
Asp	Val	Arg	Phe	Glu	Ser	Ile	Arg	Leu	Pro	Gly	Cys	Pro	Arg	Gly	Val	65	70	75	
Asn	Pro	Val	Val	Ser	Tyr	Ala	Val	Ala	Leu	Ser	Cys	Gln	Cys	Ala	Leu	80	85	90	
Cys	Arg	Arg	Ser	Thr	Thr	Asp	Cys	Gly	Gly	Pro	Lys	Asp	His	Pro	Leu	95	100	105	
Thr	Cys	Asp	Asp	Pro	Arg	Phe	Gln	Asp	Ser	Ser	Ser	Ser	Lys	Ala	Pro	110	115	120	
Pro	Pro	Ser	Leu	Pro	Ser	Pro	Ser	Arg	Leu	Pro	Gly	Pro	Ser	Asp	Thr	125	130	135	140
Pro	Ile	Leu	Pro	Gln												145			

<210> 9
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> human
 <220>
 <223> β hCG β 7 (prehormone)
 <400> 9

```

Met Glu Met Phe Gln Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Met Gly
-20                      -15                      -10                      -5

Gly Thr Trp Ala Ser Arg Glu Met Leu Arg Pro Arg Cys Arg Pro Ile
      -1  1                      5                      10

Asn Ala Thr Leu Ala Val Glu Lys Glu Gly Cys Pro Val Cys Ile Thr
      15      ..                20                25

Val Asn Thr Thr Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Pro Thr Met Met Arg Val
      30      ..                35                40

Gly Val Leu Gln Leu Pro Ala Leu Pro Gln Val Val Cys Asn Tyr Arg
45      ..                50                55                60

Asp Val Arg Phe Glu Ser Ile Arg Leu Pro Gly Cys Pro Arg Gly Val
      65                      70                75

Asn Pro Val Val Ser Tyr Ala Val Ala Leu Ser Cys Gln Cys Ala Leu
      80                      85                90

Cys Arg Arg Ser Thr Thr Asp Cys Gly Gly Pro Lys Asp His Pro Leu
      95                      100               105

Thr Cys Asp Asp Pro Arg Phe Gln Ala Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro
      110                      115                120

Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr
      125                      130                135                140

Pro Ile Leu Pro Gln
      145
  
```

<210> 10
 <211> 165
 <212> PRT
 <213> human
 <220>
 <223> eβhCG β6e (with Arg in Pos 2) (prehormone)
 <400> 10

Met Glu Met Phe Gln Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Met Gly
 -20 -15 -10 -5
 Gly Thr Trp Ala Ser Arg Glu Met Leu Arg Pro Arg Cys Arg Pro Ile
 -1 1 5 10
 Asn Ala Thr Leu Ala Val Glu Lys Glu Gly Cys Pro Val Cys Ile Thr
 15 20 25
 Val Asn Thr Thr Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Pro Thr Met Met Arg Val
 30 35 40
 Gly Val Leu Gln Leu Pro Ala Leu Pro Gln Val Val Cys Asn Tyr Arg
 45 50 55 60
 Asp Val Arg Phe Glu Ser Ile Arg Leu Pro Gly Cys Pro Arg Gly Val
 65 70 75
 Asn Pro Val Val Ser Tyr Ala Val Ala Leu Ser Cys Gln Cys Ala Leu
 80 85 90
 Cys Arg Arg Ser Thr Thr Asp Cys Gly Gly Pro Lys Asp His Pro Leu
 95 100 105
 Thr Cys Asp Asp Pro Arg Phe Gln Ala Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro
 110 115 120
 Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr
 125 130 135 140
 Pro Ile Leu Pro Gln
 145

<210> 11
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> human
 >220>
 <223> β LH β 4 (prehormone)
 <400> 11

Met Glu Met Leu Gln Gly Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Met Gly
 -20 -15 -10 -5
 Gly Ala Trp Ala Ser Arg Glu Pro Leu Arg Pro Trp Cys His Pro Ile
 -1 +1 5 10
 Asn Ala Ile Leu Ala Val Glu Lys Glu Gly Cys Pro Val Cys Ile Thr
 15 20 25
 Val Asn Thr Thr Ile Cys Ala Gly Tyr Cys Pro Thr Met Met Arg Val
 30 35 40
 Leu Gln Ala Val Leu Pro Pro Leu Pro Gln Val Val Cys Thr Tyr Arg
 45 50 55 60
 Asp Val Arg Phe Glu Ser Ile Arg Leu Pro Gly Cys Pro Arg Gly Val
 65 70 75
 Asp Pro Val Val Ser Phe Pro Val Ala Leu Ser Cys Arg Cys Ala Pro
 80 85 90
 Cys Arg Arg Ser Thr Ser Asp Cys Gly Gly Pro Lys Asp His Pro Leu
 95 100 105
 Thr Cys Asp His Pro Glu Leu Ser Gly Leu Leu Phe Leu
 110 115

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> Peptide P1 ($e\beta$ hCG)
 <400> 12

Cys Asp Asp Pro Arg Phe Gln Ala Ser Ser
 1 5 10

<210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> artificial
 <220>
 <223> Peptide K1 ($t\beta$ hCG)
 <400> 13

Cys Asp Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser
 1 5 10

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Peptide P2 (e β hCG)
<400> 14

Ser Arg Glu Met Leu Arg Pro Arg Cys Arg Pro
1 5 10

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> artificial
<220>
<223> Peptide K2 (t β hCG)
<400> 15

Ser Lys Glu Pro Leu Arg Pro Arg Cys Arg Pro
1 5 10 11

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.